



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**“*ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE  
BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO  
AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE  
CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL  
ISIDRO AYORA”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE LICENCIADO  
EN LABORATORIO CLÍNICO**

**AUTOR:**

Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

**DIRECTORA DE TESIS:**

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

**LOJA-ECUADOR**

**2015**

## CERTIFICACIÓN

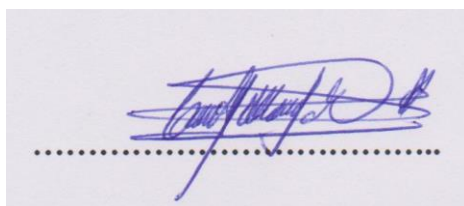
Loja, Octubre de 2015

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

**DOCENTE DEL ÁREA DE LA SALUD HUMANA DE LA UNL.**

### **CERTIFICA:**

Que la presente tesis titulada **“ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA”**, presentada por el estudiante Pablo Andrés Villavicencio Pacheco; previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico ha sido planificada y ejecutada bajo mi dirección y supervisión por lo tanto certifico que cumple con los requisitos establecidos por el Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja, para los fines legales correspondientes



**Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.**

**DIRECTORA DE TESIS**

## AUTORÍA

La presente tesis titulada **“*ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA”**, ha sido desarrollada por Pablo Andrés Villavicencio Pacheco con C.I. 1104811334. Que posee los derechos de autor y responsabilidad.

**Firma:**



**Autor:** Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

**Cédula:** 1104811334

**Fecha:** 25 de Noviembre de 2015

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Pablo Andrés Villavicencio Pacheco declaro ser autor de la tesis titulada: “**ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA**” como requisito para optar el grado de: Licenciado en Laboratorio Clínico; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 25 días del mes de Noviembre del dos mil quince, firma autor.

**Firma:**



**Autor:** Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

**Cédula:** 1104811334

**Dirección:** Av. Pablo Palacios. Barrio Carigán **Teléfono:** 2-105091 **Celular:** 0986442374.

**Correo Electrónico:** pablo-villavicencio@hotmail.com

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de Tesis:** Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:**

**Presidenta:** Lic. Glenda Alfarita Rodríguez León, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

**Vocal:** Dra. Diana Alexandra Montaña Peralta, Mg. Sc.

## **DEDICATORIA**

Con amor y cariño dedico el siguiente trabajo:

### **Primeramente a Dios:**

Por guiarme y bendecirme en todo este proceso de aprendizaje, para llegar a ser un buen profesional digno para la sociedad.

### **A mis padres:**

Que me han brindado todo su apoyo incondicional para completar mis metas propuestas; por haberme enseñado a ser un hombre de bien, por todos sus buenos consejos acertados y valores que me han otorgado a través de todos estos años de vida.

### **A mis hermanos:**

Por su apoyo, consejos y ejemplos de vida me han impulsado para cumplir este objetivo, sin darme por vencido.

### **A mis amigos:**

Que forman parte de mi vida y me han ayudado en todo este transcurso de educación superior.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primordialmente a Dios por llenarme de bendiciones en mi vida para llegar a cumplir esta meta propuesta. A mis padres que siempre me han ayudado en todas las ocasiones dentro de este transcurso de aprendizaje, con su apoyo, compañía, consejos y valores que han servido para alcanzar esta meta tan anhelada; son todo en mi vida, sin su ayuda nada de esto fuera posible, a mis hermanos de los cuáles he recibido muchos consejos y apoyo frecuente, y a una persona muy especial en mi vida que me acompañó en cada instante de mi vida y me ha ayudado en todas las ocasiones y circunstancias por las que he atravesado, Karla; a todos ustedes muchas gracias por el apoyo para haber logrado esta meta.

A la Universidad Nacional de Loja, Área de la Salud Humana, Carrera de LABORATORIO CLÍNICO por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional. De igual manera a mi directora de tesis, Lic. Carmen Ullauri González por su tiempo, apoyo, comprensión y paciencia, quien con su experiencia y conocimientos me ha brindado el apoyo necesario para poder terminar con éxito este trabajo de investigación.

También quiero agradecer al jefe del laboratorio del Hospital General Isidro Ayora, Lic. Ángel Luzón Ramírez el cual me brindó la facilidad para poder ejecutar el trabajo de campo de esta investigación, gracias por su acogida y el apoyo recibido durante todo el proceso de investigación, también a la Dra. Yomara Quizhpe responsable del área de Bacteriología de dicho hospital, quien me acompañó durante todo este proceso investigativo y me impartió conocimientos que me fueron muy útiles dentro de este trabajo.

**a. TÍTULO**

***ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA  
EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA**

## **b. RESUMEN**

La resistencia bacteriana es uno de los principales problemas de salud pública que afronta la sociedad en la actualidad, existiendo cepas resistentes a varios antibióticos que inicialmente eran eficaces no solo a nivel hospitalario sino también a nivel comunitario. Una de las bacterias comunes que ha desarrollado mecanismos de resistencia es *Escherichia coli*, que a la vez es el principal agente causal de infecciones de vías urinarias con un 95% de casos. (Pigrau, 2011)

El presente estudio descriptivo de corte transversal denominado “*Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora”; tuvo como objetivo investigar la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), su distribución según sexo, edad y correlacionarla con la IVU recurrente.

El universo del estudio fue de 233 muestras de orina, sembradas en agar sangre de cordero y agar MacConkey, se aislaron 56 cepas de *Escherichia coli*; de las cuales 8 fueron productoras de BLEE; para identificar la presencia de BLEE se siguió las instrucciones del manual del CLSI M100-S24, realizando control de calidad; como control positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

La prevalencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido fue del 14,29 % en toda la población estudiada, afectando en su totalidad el sexo femenino; encontrando un alto porcentaje de relación entre *Escherichia coli* productora de BLEE e IVU recurrente.

**Palabras clave:** (BLEE) *Betalactamasas de espectro extendido*, *Escherichia coli*, (IVU) *Infección de vías urinarias*.



## SUMMARY

Bacterial resistance is a major public health problems facing society today, existing strains resistant to several antibiotics that once were effective not only in hospitals but also at Community level. A common bacteria that has developed resistance mechanisms is *Escherichia coli*, which in turn is the main causative agent of urinary tract infections with 95 % of cases.

This descriptive cross-sectional study called "*Escherichia coli* producing extended spectrum beta-lactamases isolated from urine cultures from outpatients of General Hospital Isidro Ayora"; It aimed to investigate the presence of ESBL, distributed by sex, age and correlate with recurrent UTI.

The universe of the study was 233 urine samples sown in sheep blood agar and MacConkey agar, 56 strains of *Escherichia coli* were isolated; of which 8 were ESBL producers; to identify the presence of ESBL instructions CLSI M100- S24 manual are followed, performing quality control; as positive control *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and as negative control *Escherichia coli* ATCC 25922

The prevalence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase was 14.29% in the entire study population, affecting entire female sex; finding a high percentage of relationship between ESBL-producing *Escherichia coli* and recurrent UTI

**Keywords:** (ESBL) extended-spectrum beta-lactamases, *Escherichia coli*, (UTI) Urinary tract infection.

### c. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de vías urinarias son un problema de salud pública vigente debido a la resistencia o multirresistencia adquirida de varias bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* causantes de IVU, bacterias que han alcanzado la excelencia en la supervivencia creando diversos mecanismos que les otorga la capacidad de resistir a la acción antibiótica, fenómeno biológico denominado resistencia bacteriana presente en múltiples patógenos. (García, 2013; Merino, 2015)

Por tal motivo cada vez es más frecuente el aislamiento de bacterias que expresan mecanismos de resistencia como es el caso de *Escherichia coli*, que produce enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), capaces de inactivar a las cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y al monobactam, aztreonam. (Navarro et al., 2005)

Diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa y otras áreas geográficas como México y Colombia revelan un aumento de la prevalencia y la dispersión de las BLEE, principalmente en *Escherichia coli*. En España la frecuencia de cepas *Escherichia coli* BLEE se encuentra entre el 5-10%; mientras que a nivel de Latinoamérica hay estudios que documentan aislamientos de *Escherichia coli* productora de BLEE en urocultivos de usuarios ambulatorios, como en el país de México con una frecuencia del 15,5% y Colombia con 3,4%, existiendo diferencias entre distintos países según regiones e incluso centros sanitarios de un mismo ámbito. En nuestro medio los datos de *Escherichia coli* productora de BLEE de pacientes ambulatorios no se le ha dado la debida importancia por parte del personal de salud, por lo cual esta bacteria sigue propagándose en la comunidad, creando resistencia y con el pasar los años podría llegar a aumentar la prevalencia en nuestra localidad y ser causante de infección de vías urinarias complicadas. El cultivo es el principal modo de demostrar la presencia de cepas *Escherichia coli* productora BLEE y poder instaurar un tratamiento correcto evitando con ello el aumento de fracasos terapéuticos. (García, 2013; Merino, 2015)

Así, la presente investigación titulada *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, de tipo descriptivo y de corte transversal, contribuye con datos de nuestra realidad local, permitiendo investigar la presencia de BLEE según edad, sexo y relacionar si las infecciones de

vías urinarias recurrentes son un factor de riesgo para que *Escherichia coli* produzca enzimas betalactamasas de espectro extendido.

Así la presencia de *Escherichia coli* en urocultivos de usuarios de consulta externa que acudieron al Hospital General Isidro Ayora, se notó en 56 muestras de un total de 233, 8 productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), aisladas todas de muestras procedentes de mujeres, afectando con mayor frecuencia a la edad comprendida desde los 32 años en adelante, con 5 casos. Mientras que la relación entre las IVU recurrente y *Escherichia coli* productora de BLEE fue significativa.

Los resultados de *Escherichia coli* productora de BLEE de este estudio confirman el problema que existe, inconveniente similar a los estudios realizados a nivel de Latinoamérica donde las resistencias encontradas en el estudio ratifican la necesidad de un control en el uso de antibióticos debido a que el tratamiento empírico es una práctica habitual en nuestro medio, por tal motivo fue muy importante conocer la sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli*, donde se halló cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido.

Como el aumento de cepas *Escherichia coli* productora de BLEE constituye un importante problema en las infecciones de vías urinarias, es indispensable realizar el cultivo a los pacientes con esta sospecha previa a administración terapéutica, para así conocer cuáles son los patrones de resistencia, evitar fracasos terapéuticos y nuevas resistencias de *Escherichia coli* productora de BLEE.

## **d. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **1. INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS**

#### **1.1. CONCEPTO**

La infección de vías urinarias (IVU) es la presencia y multiplicación de microorganismos en la vía urinaria con invasión de los tejidos y, generalmente, cursa con la presencia de un gran número de bacterias en orina (bacteriuria). En la mayoría de las IVU aparecen leucocitos en orina (leucocituria o piuria) como respuesta inflamatoria a la invasión tisular por bacterias. La presencia de leucocitos en orina sí se considera un indicador fiable de IVU y su determinación ayuda a establecer el diagnóstico. (Pigrau, 2011)

#### **1.2. FACTORES PREDISPONENTES**

##### **1.2.1. EDAD**

La prevalencia de las infecciones de vías urinarias varía con la edad del paciente. En los recién nacidos y lactantes, son más comunes en los varones, la mayoría de estas infecciones se asocian con anomalías congénitas, en los niños en edad escolar existe una mayor prevalencia en las mujeres, esta relación permanece constante en la adultez. En los ancianos se puede esperar un aumento de infecciones urinarias tanto en las mujeres (20%) como en los varones (10%) en los cuales existen debido a uropatías obstructivas en la próstata, escaso vaciamiento de la vejiga por prolapso uterino y procedimientos que requieren instrumentación, tanto en hombres como en mujeres. (Koneman, 2008)

##### **1.2.2. SEXO**

Las mujeres son por mucho la población con mayor riesgo de tener infección de vías urinarias ya sea sintomático o una bacteriuria asintomática, a pesar de que la infección asintomática en este grupo no produce problemas médicos puede ser un marcador de infecciones sintomáticas futuras. Las mujeres son más susceptibles que los hombres debido a la longitud más corta de la uretra; los patógenos usuales son la flora bacteriana perianal que se origina en el tubo digestivo, sobre todo si la bacteria tiene factores que facilitan su unión al epitelio urinario. Sin embargo, conforme el hombre envejece, esta proporción tiende a igualarse. En el adulto mayor, las IVU

son las infecciones bacterianas más comunes y el origen más frecuente de bacteriemias. (Koneman, 2008; Pigrau, 2011)

### **1.2.3. MANEJO DE ANTIBIÓTICOS**

Para la selección de los antibióticos en usuarios con infecciones de vías urinarias, se debe hacer la elección del antibiótico menos tóxico, con menos efectos secundarios, que sea fácil de administrar y tenga un costo económico bajo. Se inicia el tratamiento empírico de preferencia con fluoroquinolonas como ácido nalidíxico y ciprofloxacina. La alta tasa de resistencia de los gérmenes a aminopenicilinas, cefalosporinas y trimetropin sulfametoxazol, hace que estos antibióticos sólo se usen cuando se conoce que el germen es sensible a ellos. Cuando a las 48 o 72 horas se conoce el germen, su sensibilidad y su respuesta clínica, se hace la adaptación terapéutica correspondiente. Conocido el germen y su sensibilidad se prefieren las fluoroquinolonas y trimetropin sulfametoxazol porque erradican el germen de los reservorios como el intestino, vagina y uretra, con lo que disminuyen las infecciones con recurrencia. (Gujardo et al., 2009)

### **1.2.4. ASPECTOS GENÉTICOS**

Los **factores genéticos** también representan un papel en la susceptibilidad a la recurrencia de las infecciones de vías urinarias. Sugiere una predisposición genética a la infección urinaria la estrecha relación observada en algunas pacientes, entre historia de infección urinaria en una o más de sus parientes femeninas en primer grado y su riesgo aumentado de padecer cistitis o pielonefritis recurrente, así como también el marcado clúster de pielonefritis aguda entre los parientes de niños que padecen pielonefritis. (Pigrau, 2011)

### **1.2.5 OTROS FACTORES**

Existen otros factores de riesgo que pueden llevar a una IVU como:

- El coito que facilita la colonización de vías urinarias por microorganismos vulvo-perineales, como es el caso de muchas mujeres que nunca experimentan una infección urinaria hasta que comienzan su actividad sexual. (Pigrau, 2011)

- La falta de higiene adecuada de los genitales, es un factor importante en el desarrollo de infecciones. Cuando una mujer se limpia arrastrando el papel con excremento de atrás hacia delante, lo lleva hacia el meato urinario, por lo que las bacterias, generalmente de *Escherichia coli*, penetran a la uretra y provocan la infección. (Pigrau, 2011)
- Otro factor asociado a las IVU ocurre durante el embarazo, aunque generalmente no presentan síntomas, ya que el útero al aumentar de volumen, produce presión en la vejiga y en los uréteres, lo que obstruye el flujo de la orina, ocasionando un riesgo mayor de infección. (Tumbaco, 2013)
- Las IVU son frecuentes en pacientes con diabetes mellitus mal controlada debido a que las elevadas concentraciones de azúcar en la sangre y la orina favorecen la reproducción de microorganismos. (Reyes, 2013)

### **1.3. DIAGNÓSTICO**

#### **1.3.1. SIGNOS Y SÍNTOMAS**

Las infecciones urinarias suelen comprometer la vejiga o la uretra. Los síntomas son similares para las infecciones en ambas localizaciones, por lo cual algunas veces el proceso se denomina síndrome uretral agudo. Las manifestaciones clínicas usuales son la micción frecuente y sin dolor de pequeñas cantidades de orina turbia (disuria) y malestar o dolor suprapúbico. La gran mayoría de pacientes tienen síntomas que se denominan irritativos los cuales presentan dolor, ardor, frecuencia, urgencia, malestar general, decaimiento, fiebre y dolor lumbar. (Koneman, 2008; Pigrau, 2011; Tumbaco, 2013)

#### **1.3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

##### **1.3.2.1. EMO**

El elemental y microscópico de orina (EMO) es la evaluación física, química y microscópica de la orina. Este análisis consta de muchos parámetros para detectar y medir diversos compuestos que salen a través de la orina.

- Análisis físico: Se observa a simple vista el color, aspecto, olor y volumen de la orina.

- Análisis químico: Con una tira especial (“tira reactiva”) se evalúan diversas sustancias en la orina la cual contiene pequeñas almohadillas de químicos que cambian de color cuando entran en contacto con las sustancias que se interesa analizar como es el caso de: densidad, pH, leucocitos, nitritos, sangre, urobilinógeno, cuerpos cetónicos, hemoglobina, glucosa, bilirrubina, proteínas. (Salgado, 2008)
- Análisis microscópico: Se analiza el sedimento de la muestra de orina en un microscopio. Esto se hace para observar hematíes, leucocitos, células, cristales urinarios, moco, bacterias, etc. (Salgado, 2008)

### **1.3.2.2. UROCULTIVO**

El urocultivo es la técnica de referencia para el diagnóstico de IVU. La técnica de cultivo cuantitativo más utilizada es la siembra con asa calibrada, que permite depositar sobre la superficie del medio de cultivo un volumen determinado de orina. En general, se suelen emplear asas de 0,001 ml o 0,01 ml, de forma que se puede cuantificar bacteriurias entre 100–1.000 UFC/ml y más de 100.000 UFC/ml. (Pigrau, 2011)

Interpretación del urocultivo

Menos de 1.000 ó 10.000 UFC/ml, se informará: “Menos de 1.000 ó 10.000 UFC/ml”.

De 10.000 a 100.000 UFC/ml.

- Un patógeno sin células epiteliales: informar microorganismo, número de colonias, antibiograma y valorar clínicamente.
- Dos patógenos: informar microorganismos, número de colonias y solicitar nueva muestra.
- Más de dos patógenos: informar “Cultivo mixto, probable contaminación”.

Mayor a 100.000 ó más UFC/ml

- Uno o dos patógenos: informar identificación más antibiograma.
- Más de dos especies: informar “cultivo mixto, probable contaminación”. (Pigrau, 2011)

## **2. ENTEROBACTERIAS**

### **2.1 GENERALIDADES**

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. (Puerta, 2010)

Las Enterobacteriaceae son anaerobios o aerobios facultativos, no forman esporas, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Son bacilos gramnegativos, ya sea móviles con flagelos, peritricosos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros suplementos; se multiplican bien en agar de MacConkey, fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas, catalasa positiva, oxidasa negativa, y reducen nitrato a nitrito. (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2011)

Son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, tienen pocas exigencias nutritivas y cierta resistencia a agentes externos. En ciertas ocasiones pueden producir procesos patológicos intra o extra intestinal. (Alarcón, 2011)

### **2.2. *ESCHERICHIA COLI***

#### **2.2.1 GENERALIDADES**

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados. Es un habitante normal del intestino del hombre y de los animales, que no obstante puede ser agente etiológico de trastornos gastrointestinales graves en niños menores de 3 años y causar septicemias e infecciones a nivel de los tractos biliar y urogenital. (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2011)



### **2.2.2. MORFOLOGÍA**

*Escherichia coli* es un bacilo corto y grueso de 1 a 4 micras de largo por 0.4 a 0.8 micras de ancho, es gram negativo, no esporulado, no capsulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil con flagelos peritricos, están desprovistos de oxidasa, producen catalasa y  $\beta$ -galactosidasa, y normalmente reducen nitrato a nitrito. (Alvarado, 2011)

### **2.2.3. TAXONOMÍA**

- Reino: *Protista procariota*.
- Filo: *Proteobacteria*
- Clase: *Gamma proteobacteria*
- Orden: *Enterobacteriaceae*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Escherichia*
- Especie: *E. coli* (Alvarado, 2011)

### **2.2.4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA**

La *Escherichia coli* posee 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H). El antígeno O es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la bacteria, y posee 60 capsulares (K) que corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *Escherichia coli*. (Alarcón, 2011)

### **2.2.5 IDENTIFICACIÓN EN EL LABORATORIO**

#### **2.2.5.1. MEDIOS DE CULTIVO**

El diagnóstico es fundamentalmente directo, mediante cultivo e identificación. La enterobacterias crecen bien en medios de cultivo comunes (agar sangre) y selectivos (agar

MacConkey) y una vez obtenido el crecimiento de colonias, se lleva a cabo la identificación mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas. (Britanialab, 2011)

**Agar Sangre:** Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos al ser suplementado con sangre ovina al 5%, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y permite la clara visualización de reacciones de hemólisis. (Britanialab, 2011)

**Agar MacConkey:** Es un medio diferencial selectivo utilizado para aislar bacterias gramnegativas. Este medio permite detectar la utilización de lactosa por el microorganismo de prueba, para diferenciar entre bacterias que producen fermentación de lactosa de no fermentadoras de lactosa. (Koneman, 2008)

#### **2.2.5.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Para la diferenciación de *Escherichia coli* y otras enterobacterias se utilizan las pruebas bioquímicas que se basan principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas dirigen el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de varias vías que pueden detectarse mediante medios especiales utilizados en técnicas de cultivo in vitro. Se incorporan al medio de cultivo sustratos sobre los cuales pueden reaccionar estas enzimas, junto con un indicador que puede detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. (Koneman, 2008)

Las principales pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Escherichia coli* son:

**Urea:** Es una diamida del ácido carbónico. Todas las amidas se hidrolizan fácilmente, con la liberación de amoníaco y dióxido de carbón. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. La ureasa es una enzima que tienen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar la urea. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumenta el pH del medio.

(Koneman, 2008)

**Citrato:** Es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico simple que se encuentra como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). La utilización de citrato por la bacteria que se va a probar se detecta en el medio de citrato por la producción de subproductos alcalinos. El medio contiene citrato de sodio, que es un anión, como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco ( $\text{NH}^+$ ), lo que produce la alcalinización del medio por conversión del  $\text{NH}^{2+}$ , a hidróxido de amonio ( $\text{NH}^4\text{OH}$ ). El indicador es el azul de bromotimol, que es amarillo debajo de pH 6 y azul por encima de pH 7,6. (Koneman, 2008)

**Lisina:** En la descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. Este proceso, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada. Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. (Himedia, 2011)

**TSI:** Es una prueba usada para la fermentación de la glucosa, lactosa y sacarosa y la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  por parte de la bacteria sumándole producción de gas. El cambio de color rojo-anaranjado a amarillo indica fermentación. Si se fermenta únicamente la glucosa el cambio de color del medio ocurre solamente en el fondo debido a que se encuentra 10 veces menos concentrada que la sacarosa y la lactosa, además los radicales libres no son suficientes para hacer virar el medio. Si se fermentan los 3 azúcares hay cambio de color tanto en la superficie como en el fondo. La presencia de burbujas que rompen el medio y a veces tienden a expulsarlo indica presencia de gas como producto final de la fermentación. La producción de  $\text{H}_2\text{S}$  se manifiesta por la aparición de un precipitado color negro debido a la reducción de la sal de hierro presente en el medio. (Himedia, 2011)

**SIM:** Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. El indol, es uno de los productos de la degradación

metabólica del amino ácido triptófano. Las bacterias que producen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de Indol, ácido pirúvico y amoniaco. La prueba del indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs. (Koneman, 2008)

### **2.2.5.3. MÉTODOS SEROLÓGICOS**

Los métodos serológicos se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente microbiano con su anticuerpo correspondiente; que sirven para detectar y caracterizar infecciones en las que el diagnóstico directo fenotípico o genotípico no es posible. Además sirven para determinar el grado de inmunidad, es decir si se poseen suficientes anticuerpos específicos para hacer frente a futuras infecciones. (Preparadores de oposiciones a la enseñanza, 2005)

Hay diversos métodos, por lo que la sensibilidad y especificidad varían según éstos y la bacteria a estudiar. Entre las principales técnicas tenemos:

**Técnicas de aglutinación:** La aglutinación se produce cuando los anticuerpos del suero problema detectan a sus antígenos específicos. Son técnicas muy sensibles, pero tienen que realizarse de forma manual, ya que son de difícil automatización. Los resultados obtenidos dependen de la cantidad y avidéz de los anticuerpos, tiempo de incubación y condiciones fisicoquímicas del ensayo. Por ello las pruebas deben incluir controles positivos y negativos que aseguren la fiabilidad de los resultados. (Preparadores de oposiciones a la enseñanza, 2005)

a). Aglutinación con bacterias completas: Técnica sencilla que se realiza en portaobjetos, enfrentando el suero problema a suspensiones de bacterias conocidas. Si la prueba es positiva, las bacterias aglutinan.

b). Aglutinación de partículas: se usan partículas inertes de látex unidas a los antígenos específicos a buscar, que se enfrentan al suero problema. Si la prueba es positiva, las partículas se agregan y precipitan.

c). Hemaglutinación: utiliza hematíes unidos a los antígenos. Si existen anticuerpos específicos, los eritrocitos se aglutinan, formando grumos detectables a simple vista.

**Enzimoimmunoanálisis (EIA):** Es la técnica inmunoanalítica más utilizada por su alta sensibilidad y por su fácil automatización. Se caracteriza por usar un marcador enzimático, que cataliza una reacción que da como resultado un compuesto coloreado. Si el marcador es fluorescente, la técnica se denomina fluoroinmunoanálisis (FIA).

Tiene el inconveniente de requerir instrumental avanzado y más costoso. Los resultados positivos deben ser confirmados por otro sistema más específico como el Western-Blot. Consiste en someter a electroforesis en gel las proteínas purificadas del microorganismo y se obtienen unas tiras que sirven como antígeno en fase sólida para la realización de un nuevo EIA. (Preparadores de oposiciones a la enseñanza, 2005)

#### **2.2.5.4 MÉTODOS AUTOMATIZADOS**

Los procedimientos manuales están siendo superados por métodos automatizados en el área de bacteriología, buscando superar las dificultades de la mecanización bacteriológica. Los métodos automatizados sirven para la detección de microorganismos en muestras clínicas, identificación de los mismos y la susceptibilidad antimicrobiana; lo cual aumenta la capacidad del laboratorio, de elevar la exactitud de algunas determinaciones, proveer resultados a corto plazo y reducción de costos. Los sistemas automatizados se basan en determinaciones ópticas de crecimiento bacteriano por transmisión de la luz o fotometría, fotodispersante, radiometría, bioluminiscencia e impedancia eléctrica. Estos sistemas automatizados poseen paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos. La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un índice alto de fiabilidad, la identificación del microorganismo. Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, Wider, Phoenix, etc (Fernández et al., 2010)

## **2.2.6. SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.**

Las cepas de *Escherichia coli*, como las otras bacterias Gram-negativas, son intrínsecamente resistentes a los antibióticos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico. Los antibióticos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *Escherichia coli* patógenas extraintestinales son la amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *Escherichia coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante antibiograma. Resistencia adquirida a los aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetropin se ha descrito para cepas de *Escherichia coli* por cuatro mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano y desvío de una etapa metabólica. Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *Escherichia coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas (15 a 30%) las cepas resistentes a las cefalosporinas de 1ª generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, gentamicina, tobramicina, amikacina, colistina y polimixina B. (Faleiro, 2010)

## **3. ANTIBIÓTICOS**

### **3.1. CONCEPTO**

Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetes), que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente pueden destruirlos. El uso común ha extendido el término de antibiótico a agentes antibacterianos sintéticos como sulfonamidas y quinolonas. (CLSI, 2009)

### **3.2. CLASIFICACIÓN**

**Según su efecto**

- **Bacteriostáticos:**

Aquellos antibacterianos que a las concentraciones que se alcanzan en el suero o los tejidos, inhiben el crecimiento de las bacterias, favoreciendo su posterior destrucción por el sistema inmunológico del paciente, pero que, por sí mismos, no destruyen a las bacterias, las cuales permanecen viables donde al suspender el tratamiento, pueden desarrollarse de nuevo. (Azuero, 2013)

- **Bactericidas:**

Son aquellos antimicrobianos que ocasionan la lisis de las bacterias. Con efectos irreversibles. (Azuero, 2013)

### **Según su mecanismo de acción**

Los antibacterianos ejercen sus efectos mediante diversos mecanismos

Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular: Entre éstos se incluyen:

- Betalactámicos
- Vancomicina
- Cicloserina (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2011).

Agentes que alteran la función de la membrana celular, afectando su permeabilidad. Se incluye:

- Polimixina B
- Anfotericina B
- Colistina
- Imidazoles y triazoles (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2011).

Agentes que inhiben la síntesis proteica: Se incluyen antibióticos que actúan contra las unidades funcionales en la síntesis proteica de las bacterias que son los ribosomas.

- Aminoglucósidos
- Tetraciclinas
- Macrólidos
- Cloranfenicol
- Lincomisinas (Jawetz, Melnick & Adelberg, 2011).

Agentes que inhiben la síntesis o función de los ácidos nucleicos: Interfieren con la síntesis o función de los ácidos nucleicos mediante tres mecanismos:

- Inhibiendo la replicación del ADN.- Quinolonas
- Impidiendo la transcripción.- Rifampicina, Actinomicina
- Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales (bloqueo de la formación de bases purinas y pirimidinas).-Sulfonamidas, Diaminopirinas (Trimetropin, Pirimetamina, Metrotexasate). (Azüero, 2013)

### **Según su espectro antibacteriano**

Se divide en tres grupos:

- **De espectro reducido:** Agentes que actúan sólo contra un escaso grupo de gérmenes. Ejemplo Penicilina G, que es activa básicamente contra cocos Gram positivos.
- **De espectro amplio:** Término usado para designar aquellos agentes que son eficaces contra Gram positivos y, además contra un grupo significativo de gramnegativos. Ejemplo la Ampicilina que es activa contra los mismos gérmenes que la penicilina G y que, además, es activa contra algunos gramnegativos
- **De amplio espectro:** Son activas contra múltiples grupos de gérmenes (Gram positivos, gram negativos). Por ejemplo las tetraciclinas. Cloranfenicol, macrólidos, etc. (Azüero, 2013)

### **3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN**

#### **Desorganización de la membrana citoplasmática**

La membrana celular constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo, los antibióticos alteran la capacidad de las membranas de actuar como barreras selectivas, por ende se altera la integridad funcional de la membrana, y los iones y macromoléculas se escapan produciendo que la célula se lesione y muera.

(Azüero, 2013; Paredes, 2004)



## **Inhibición de la síntesis de proteínas**

Los antimicrobianos inciden sobre los ribosomas, sobre la subunidad 30 S y 50 S que conforman el ribosoma 70 S, unidad funcional de la síntesis de proteínas en las bacterias, en tanto que los ribosomas de los mamíferos son 80 S y no se dividen en subunidades. Esto explicaría por qué los fármacos antimicrobianos pueden inhibir la síntesis en los ribosomas bacterianos, sin tener efecto sobre los ribosomas de los mamíferos.

(Azüero, 2013; Paredes, 2004)

## **Interferencia en la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos**

Existen tres posibles mecanismos por los que los antimicrobianos pueden modificar la síntesis de los ácidos nucleicos.

- Interfiriendo la replicación del ADN
- Impidiendo la transcripción.
- Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales. (Paredes, 2004)

## **Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico**

Las sulfamidas inhiben la incorporación del PABA para la formación del ácido fólico, de aquí su efecto antibacteriano selectivo. Las diaminopirimidinas inhiben la dihidrofólicoreductasa e impiden el paso de ácido fólico a folínico (paso necesario para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas). (Paredes, 2004)

## **3.4. ANTIBIÓTICOS PARA ENTEROBACTERIAS**

Los antibióticos principales utilizados para el género *Enterobacteriaceae* son:

### **Cefalosporinas:**

Se componen de un anillo betalactámico unido a uno de dihidrotiazina. El mecanismo de acción es similar al de las penicilinas, interfiriendo con los mecanismos de síntesis de la pared bacteriana, además de su acción contra las PBP. Las modificaciones sobre los anillos, determinan las diferentes generaciones que existen de cefalosporinas, dando lugar a las de primera, segunda,

tercera y cuarta generación presentando cada una diferente espectro de acción. Las cefalosporinas de primera generación tienen buena actividad contra microorganismos Gram positivo, pero baja actividad contra Gram negativo (cefalotina, cefazolina). Las de la segunda generación son estables contra ciertas betalactamasas incrementando su actividad contra Gram negativo. Su actividad se extiende a *Enterobacter* y *Serratia*. No son activas contra *Pseudomonas*. Las de tercera generación son menos activas que las de primera generación en relación a bacterias Gram positivo siendo más activas contra la familia *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa*. Presentan más estabilidad frente a betalactamasas. Su espectro incluye algunos bacilos Gram negativo, además de *Pseudomonas*. Los de cuarta generación tienen un espectro de acción, que incluye la mayoría de bacterias Gram positivo y negativo y *Pseudomonas*. La alteración de las PBP, junto con los cambios de la pared externa de la bacteria, son los mecanismos responsables de la resistencia a este grupo farmacológico. La cefepime y la cefpiroma son cefalosporinas de la cuarta generación, su diferencia con las de tercera generación radica en ser más estables a la hidrólisis de las betalactamasas e inducen débilmente las enzimas de esa índole. De este modo actúan contra muchas enterobacterias resistentes a otras cefalosporinas, pero siguen siendo sensibles a otras, que expresan betalactamasas mediadas por plásmidos de espectro extendido. (Alarcón, 2011)

### **Penicilinas:**

Compuestas por un anillo betalactámico unido a un anillo de tiazolidina con una cadena lateral que les confiere diferentes características. Al manipular la cadena, se logra modificar a los compuestos y obtener diferentes clases penicilinas. Algunas bacterias poseen enzimas llamadas betalactamasas, que alteran el anillo betalactámico y logran inactivar el medicamento. Estos fármacos actúan alterando la síntesis de pared bacteriana, inhibiendo enzimas que crean uniones peptídicas como: transpeptidasa, carboxipeptidasa, endopeptidasa; conocidas como proteínas unidoras de penicilinas (PBP) y activando el sistema autolítico. Las carboxipenicilinas y ureido penicilinas tienen incremento de actividad contra Gram negativo. (Alarcón, 2011)

### **Aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos son agentes antimicrobianos estructuralmente relacionados, con un mecanismo de acción ribosómico que inhibe la síntesis proteica bacteriana. Esta clase incluye

agentes con distinta estabilidad frente a las enzimas que inactivan los aminoglucósidos, dando lugar a diferentes espectros de actividad. Los aminoglucósidos se usan principalmente para tratar infecciones causadas por bacilos aerobios gramnegativos o en combinación sinérgica con agentes antimicrobianos activos que actúan sobre la pared celular (por ejemplo, penicilina, ampicilina, vancomicina) contra algunas bacterias grampositivas, como los enterococos. (CLSI, 2009)

### **Monobactámicos**

Los antibióticos monobactames son betalactámicos monocíclicos. Actualmente, el aztreonam, que tiene actividad sólo contra bacterias aerobias gramnegativas. (CLSI, 2009)

### **Inhibidores de betalactamasas**

Estos agentes antimicrobianos son combinaciones que incluyen un antibiótico de la clase de las penicilinas y un segundo agente con actividad antibacteriana mínima, pero que funciona como inhibidor de algunas betalactamasas. Actualmente se usan tres son inhibidores de betalactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los resultados de las pruebas de sensibilidad que se obtienen al ensayar únicamente la penicilina frente a organismos productores de betalactamasa, no sirven normalmente para predecir la sensibilidad de la bacteria a la combinación de los dos fármacos. (CLSI, 2009)

## **4 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *ESCHERICHIA COLI***

### **4.1. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO**

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), tienen lugar cuando hay mutaciones cercanas al sitio activo. Las BLEE tienen un espectro de resistencia más amplio, en cual está contenido el dominio de cefalosporinas de tercera y cuarta generación así como monobactámicos. El mecanismo común de resistencia de la bacteria para antibióticos betalactámicos, es la producción de enzimas betalactamasas que destruyen la estructura del anillo betalactámico. (Alarcón, 2011)

El control genético de la producción de betalactamasas es inducido por un plásmido o cromosoma. Una gran cantidad de plásmidos provienen de las enzimas TEM-1, TEM-2, y SHV1 estas enzimas le confieren resistencia a penicilinas pero no para las nuevas cefalosporinas. Estas enzimas hidrolizan drogas como ceftazidime, cefotaxime, y aztreonam, pero tienen pequeños

efectos en cefamicina, cefoxitin y cefotetan. Las BLEE han mutado de los genes de las TEM-1 y SHV-1, acarreados en los plásmidos que fueron transmitidos de otros organismos. Cambios minoritarios relativos en la secuencia de los genes originales han causado alteraciones significativas en la afinidad de la enzima hacia el sustrato. La hidrólisis de ceftazidime, cefotaxime y aztreonam ha ocurrido en rangos mayores de 10 por ciento de las benzilpenicilina. Estas enzimas pueden ser bloqueadas por inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico. (Alarcón, 2011; García, 2010)

## **4.2. OTROS MECANISMOS**

Existen otras enzimas responsables de la aparición de resistencia ante los antimicrobianos además de las betalactamasas tal es el caso de las metilasas, acetil transferasas, nucleotidil transferasas y fosfotransferasas que inactivan especialmente a los aminoglucósidos. Así la acetil transferasa AAC (6`)-Ib y a la 16S rARN metilasas las cuales confieren resistencia a varios aminoglucósidos entre los cuales están kanamicina, amikacina y trobamicina. Las metilasas 16S rARN han emergido como un potente mecanismo de resistencia a todos los aminoglucósidos usados actualmente y han sido descritos en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, los genes responsables de la producción de estas metilasas por las bacterias se han encontrado en plásmidos que portan otros genes de resistencia, lo cual lleva a patrones multiresistentes en bacterias gram negativas. (Tafúr, Torres & Villegas, 2008)

## **5. ANTIBIOGRAMA**

### **5.1. GENERALIDADES**

Una vez que se ha determinado que un cultivo es significativo, el microbiólogo debe realizar el antibiograma. Así resulta suficiente en la gran mayoría de los casos, el ensayo de difusión con discos en agar (método de Kirby-Bauer). El antibiograma es un método de estudio in vitro del comportamiento de los antimicrobianos (antibióticos y quimioterapéuticos) frente a los agentes infecciosos. Tiene como finalidad proporcionar información útil para la iniciación y marcha de la terapéutica anti infecciosa. Con los resultados obtenidos del antibiograma clasificamos las bacterias en: sensibles, moderadamente sensibles y resistentes, a un determinado antimicrobiano. (Alvarado, 2011; Camacho, 2013)

- ✓ **Sensibilidad:** Se considera sensible a un determinado antibiótico cuando este puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria.
- ✓ **Sensibilidad intermedia:** Es la que se refiere al microorganismo que no es afectado por dosis normales de antibiótico dadas a intervalos adecuados, pero que si la dosis se eleva no existen efectos tóxicos y la actividad es la adecuada.
- ✓ **Resistente:** Se considera resistente a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección no es suficiente para afectarle o que la concentración de la droga es inferior a la CMI necesaria para eliminar el germen, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis.  
(CLSI, 2009)

## 5.2. MÉTODO DE ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN KIRBY-BAUER

### Principio

Un comité del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ha evaluado y revisado continuamente el procedimiento de difusión con discos. El establecimiento de una prueba estándar nacional para la difusión con discos no sólo ha permitido un control de calidad más exacto, sino también una comparación válida de los resultados entre diferentes laboratorios que utilizan este procedimiento. El comité publica actualizaciones periódicas con nueva información y los cambios sugeridos por los usuarios. Es importante mantener la actualización del procedimiento. El diámetro de los halos que se forman con la prueba no tiene sentido sin referencia a los correlatos y guías interpretativas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) publicados por el CLSI. (Koneman, 2008)

Los parámetros mínimos a controlar en las placas de agar Mueller Hinton son:

1. El pH del Mueller Hinton debe estar entre 7,2 y 7,4 por tal motivo el control del pH del medio debe realizarse con pHmetro de sensibilidad de + 0,01 unidades de pH. (WHONET, 2014)
2. El contenido de cationes Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> afecta el resultado de las pruebas de sensibilidad para algunas drogas como aminoglucósidos, tetraciclinas, etc. El contenido de cationes del agar se puede determinar prácticamente a través del ensayo de *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a los discos de aminoglucósidos, especialmente gentamicina. Los halos de inhibición obtenidos

deberían encontrarse dentro de los recomendados en la Tabla 3 del documento M100S15 del CLSI. (WHONET, 2014)

3. El contenido de  $Zn^{++}$  del agar Mueller Hinton afecta el resultado de las pruebas de sensibilidad de los carbapenemes. La forma práctica de evaluar el contenido de este catión es a través de la *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente a imipenem. Los halos de inhibición obtenidos deberían encontrarse dentro de los recomendados en la Tabla 3 del documento M100S15 del CLSI. (WHONET, 2014)

4. El contenido de Timina/timidina del agar Mueller Hinton afecta el resultado de las pruebas de sensibilidad para trimetoprima y las sulfonamidas o la combinación de ambas drogas (trimetoprima-sulfametoxazol). Para evaluar el contenido de Timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol. Un medio adecuado mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más. (WHONET, 2014)

5. La profundidad de las placas de agar Mueller Hinton deben ser de aproximadamente 4 mm. Ante la falta de parámetros establecidos para la variabilidad aceptable de la profundidad de la placa de agar Mueller Hinton para las pruebas de sensibilidad por difusión, la Red WHONET-Argentina ha tomado una variación permitida de + 0,5 mm. Por lo tanto las placas serán aceptables si tienen una profundidad entre 3,5 y 4,5 mm. (WHONET, 2014)

### **5.3. IDENTIFICACIÓN DE BLEE EN EL LABORATORIO**

#### **5.3.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN Y DILUCIÓN**

##### **MÉTODO POR DIFUSIÓN**

Este procedimiento inicialmente se realiza el método de tamizaje, para el cual se utiliza Agar Mueller Hinton. El inóculo a emplearse se obtiene de la suspensión bacteriana, equivalente al standard 0,5 McFarland, este inóculo es extendido en toda la placa de agar. Los discos antimicrobianos usados en este método de tamizaje para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Escherichia coli* son cefpodoxima (10 ug), ceftazidima (30ug), aztreonam (30 ug), cefotaxima (30 ug), ceftriaxona (30 ug). Una vez colocados los discos en la placa de agar, esta se

incuba a 35 +2°C, durante 16 a 20 horas. El uso de más de un disco aumenta la probabilidad de detección de cepas BLEE. El resultado se interpreta como cepa sospechosa de BLEE, si al menos uno de los siguientes diámetros del halo de inhibición están presentes en los siguientes valores: cefpodoxime < 17mm, ceftazidima < 22mm, aztreonam < 27 mm, cefotaxima < 27 mm, ceftriaxona < 25 mm. La cepa sospechosa deberá ser sometida a una nueva prueba para determinar la confirmación del fenotipo productor de BLEE según lo establecido en el manual del CLSI. (CLSI, 2014).

## **MÉTODO POR DILUCIÓN**

El CLSI contempla el método por concentración mínima inhibitoria (CMI) para las pruebas de tamizaje y de confirmación del fenotipo productor de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. En el caso de método de tamizaje, éste indica como bacteria sospechosa de BLEE cuando la CMI es  $\geq 2$  g/ml para todos los antibióticos evaluados (ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona) excepto cefpodoxime cuya CMI es  $\geq 8$  g/ml. (CLSI, 2014).

Para la prueba confirmatoria por CMI se interpreta como resultado positivo una diferencia  $\geq 3$  diluciones entre la CMI de la cefalosporina evaluada sola (ceftazidima, cefotaxima) y en combinación de estas con ácido clavulánico, confirmando así la presencia del fenotipo productor de BLEE (CLSI, 2014).

### **5.3.2. CONFIRMACIÓN DE BLEE**

Para la prueba de confirmación por disco difusión, usando el método establecido por el manual del CLSI, se emplea igualmente agar Mueller Hinton, en donde se extiende el inóculo de la suspensión bacteriana, equivalente al standard 0,5 McFarland. El período de incubación va desde 16 a 18 horas, a 35 +2°C de temperatura y los tipos de discos empleados son: cefotaxima (30 ug), cefotaxima más ácido clavulánico (30 /10 ug) y ceftazidima (30 ug), ceftazidima más ácido clavulánico (30/10 ug.). Para este test confirmatorio se recomienda usar los dos tipos de cefalosporinas solas y combinadas con el ácido clavulánico. El resultado confirmatorio para establecer el fenotipo productor de BLEE está determinado por la diferencia de  $\geq 5$  mm entre el halo de inhibición del disco de cefalosporina sola y su respectivo disco cefalosporina más clavulánico (CLSI, 2014).

## **e. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **TIPO DE ESTUDIO**

La presente investigación fue de tipo descriptivo y de corte transversal.

### **ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en el Área de Bacteriología del laboratorio clínico del Hospital General Isidro Ayora, mismo que tiene una cobertura que abarca la ciudad y provincia de Loja, ubicado en la calle principal Avenida Iberoamericana y calle secundaria Juan José Samaniego contando con 243 camas hábiles al servicio de la comunidad, entidad pública que presta servicios de salud de segundo nivel ofreciendo servicios de: emergencia, hospitalización, cirugía general, odontología, fisioterapia, laboratorio clínico, imagenología, gineco obstétrico, neonatología, pediatría, unidad de cuidados intensivos, unidad de quemados, hemodiálisis y consulta externa.

### **UNIVERSO**

233 usuarios con pedido de urocultivo que constituyeron el universo del presente estudio durante el periodo de Abril a Junio de 2015.

### **MUESTRA**

Conformada por 56 cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de pacientes de consulta externa durante el periodo de Abril a Junio de 2015, después de cumplir con los criterios de inclusión y exclusión.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes de consulta externa con pedido de urocultivo durante el periodo de Abril a Junio de 2015.
- Urocultivos positivos con conteo mayor a 100 000 UFC/ml de orina.
- Personas que contestaron la encuesta voluntariamente.



## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Muestras con pedido de urocultivo provenientes de otra área que no sea consulta externa.
- Urocultivos con conteo menor a 100 000 UFC/ml de orina.
- Muestras mal recolectadas:
  - Muestras recogidas en otros frascos no estériles.
- Personas que se negaron a responder la encuesta.
- Muestras con crecimiento de 3 o más colonias diferentes.

## **MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

### **Fase pre analítica**

- Oficio dirigido al Gerente del Hospital donde se solicitó y se autorizó el permiso para trabajar con las muestras del laboratorio clínico del Hospital General Isidro Ayora. (ANEXO 1)
- Oficio al Jefe del Laboratorio del Hospital General Isidro Ayora para solicitud y autorización del uso de las instalaciones. (ANEXO 2)
- Las muestras de orina se recibieron a las personas de consulta externa que llevaron el pedido de Urocultivo a las cuales se les aplicó una encuesta. (ANEXO 3)
- Se trabajó con medios de cultivo Agar Sangre de Cordero ya preparados para garantizar la calidad del medio. (ANEXO 4)

### **Fase analítica**

- Se prepararon medios de cultivo como: agar MacConkey, Mueller Hinton y pruebas bioquímicas: TSI, Citrato, Urea, Lisina y SIM. Se trabajó con el reactivo de Kovacs ya preparado en el hospital y sometido a pruebas de control con cepas ATCC (ANEXOS: 5,6,7,8,9,10,11 y 12 respectivamente)

- Se realizó prueba piloto con cepas de control ATCC, control positivo *Klebsiella pneumoniae* 700603 productora de BLEE y control negativo *Escherichia coli* 25922 las cuales fueron previamente preparadas. (ANEXO 13)
- Las cepas de control ATCC, *Klebsiella pneumoniae* 700603 y *Escherichia coli* 25922 fueron sometidas a procesos de conservación con el motivo de mantenerlas durante todo el proceso de investigación. (ANEXO 14)
- Durante el muestreo de la investigación se realizó el urocultivo mediante la técnica de asa calibrada en Agar Sangre de Cordero y MacConkey. (ANEXO 15)
- En las muestras que tuvieron crecimiento mayor a 100 000 UFC/ml se realizó la tinción de Gram para diferenciar el tipo de bacteria y de las bacterias gram negativas se procedió a realizar las pruebas bioquímicas para su identificación. (ANEXO 16)
- A todas las muestras identificadas con las pruebas bioquímicas como *Escherichia coli*, se realizó el tamizaje para búsqueda de producción de BLEE y confirmación de acuerdo al protocolo N° 3 del manual CLSI. M100-S24. (ANEXO 17 Y 18)

### **Fase post analítica**

- Se registraron todos los resultados de las muestras trabajadas en el formato de registros. (ANEXO 19)

### **PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

Para la presentación de resultados de esta investigación se utilizó técnicas de estadística descriptiva utilizando el programa de Microsoft Excel.

Los resultados obtenidos se presentan calculando frecuencias y porcentajes, en gráficos de barras estadísticas.

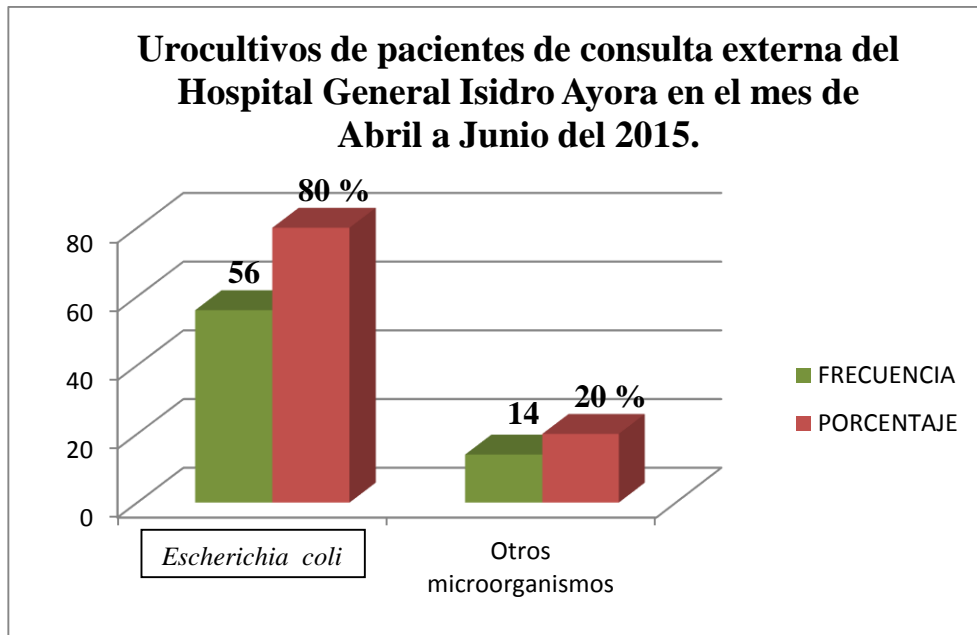
## f. RESULTADOS

**TABLA N° 1. *Escherichia coli* aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, Abril-Junio de 2015.**

UROCULTIVOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Escherichia coli</i>	56	80,00
Otros microorganismo	14	20,00
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>100,00</b>

Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

**GRÁFICO N° 1**



Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

### **Interpretación:**

Del total de muestras procesadas en un 80% se aisló *Escherichia coli* y 20 % corresponde a otros microorganismos entre los cuales se identificó *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus* y *Pseudomona aeruginosa*, por lo tanto *Escherichia coli* fue el agente causal que más predominó, siendo el principal agente de infecciones urinarias en un 80 a 90% de los casos según otras investigaciones; el resto de las infecciones son causadas por otras enterobacterias (Avendaño, 2008)

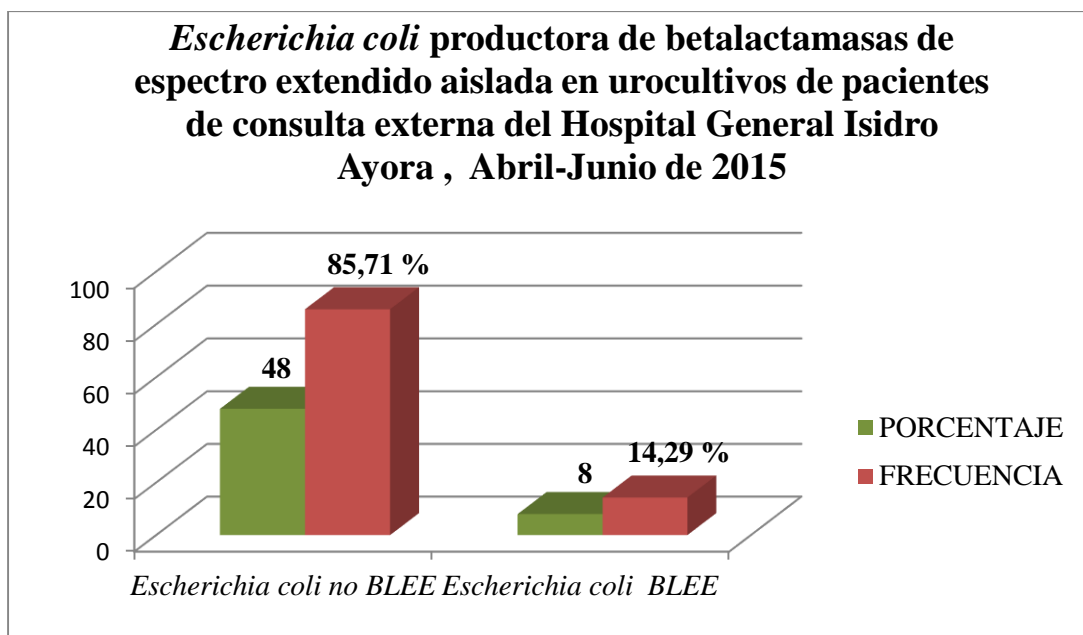
**TABLA N° 2. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, Abril-Junio de 2015**

Cepas aisladas	PORCENTAJE	FRECUENCIA
<i>Escherichia coli</i> no productora de BLEE	48	85,71
<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE	8	14,29
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>100,00</b>

Fuente: Registros de investigación.

Elaborado por: Pablo Villavicencio

**GRÁFICO N° 2**



Fuente: Registros de investigación.

Elaborado por: Pablo Villavicencio

### **Interpretación:**

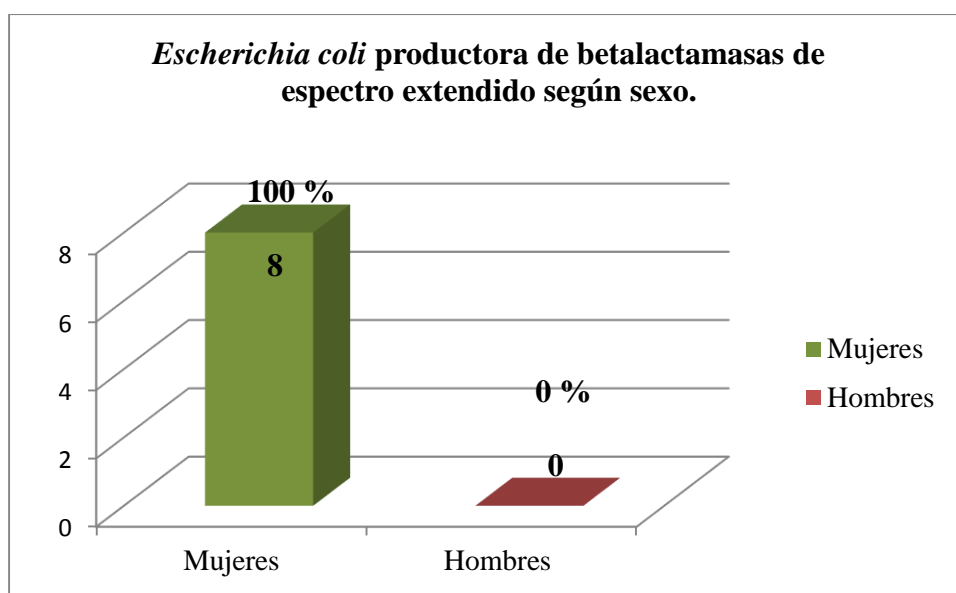
Se calculó la prevalencia de *Escherichia coli* BLEE según la fórmula que es Prevalencia = Número de casos existentes/ Número total de individuos en ese momento. La cual nos da una prevalencia del 14,29 % (n=8); estas cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido, producen enzimas betalactamasas cromosómicas o extracromosómicas mediadas por plásmidos confiriéndoles resistencia a los betalactámicos. (García, 2013)

**TABLA N° 3. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido según sexo.**

SEXO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Mujeres	8	100
Hombres	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

**GRÁFICO N° 3**



Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

**Interpretación:**

Las 8 cepas de *Escherichia coli* que fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se aislaron en muestras de orina de mujeres lo que representa el 100% de los casos.

Esto podría deberse a que las infecciones de vías urinarias son más frecuentes en las mujeres que en los hombres en una relación de 10:1 debido a la ubicación de los genitales femeninos cercanos a la región perineal y perianal en la mujer. (Corozo, 2013)

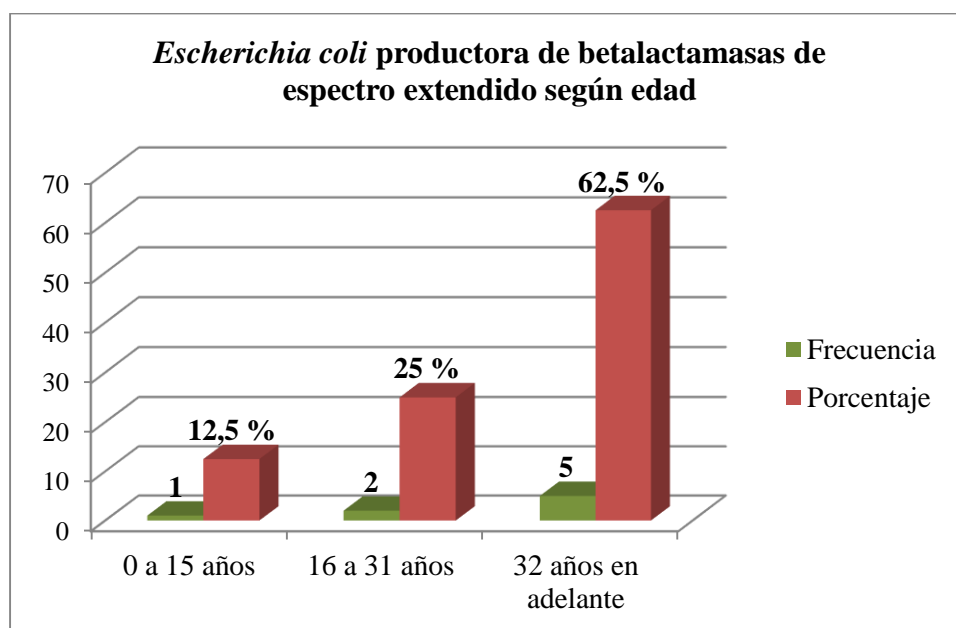
**TABLA N° 4. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido según edad**

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
0 a 15 años	1	12,5
16 a 31 años	2	25
32 años en adelante	5	62,5
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Fuente: Registros de investigación.

Elaborado por: Pablo Villavicencio

**GRÁFICO N° 4**



Fuente: Registros de investigación.

Elaborado por: Pablo Villavicencio

### **Interpretación:**

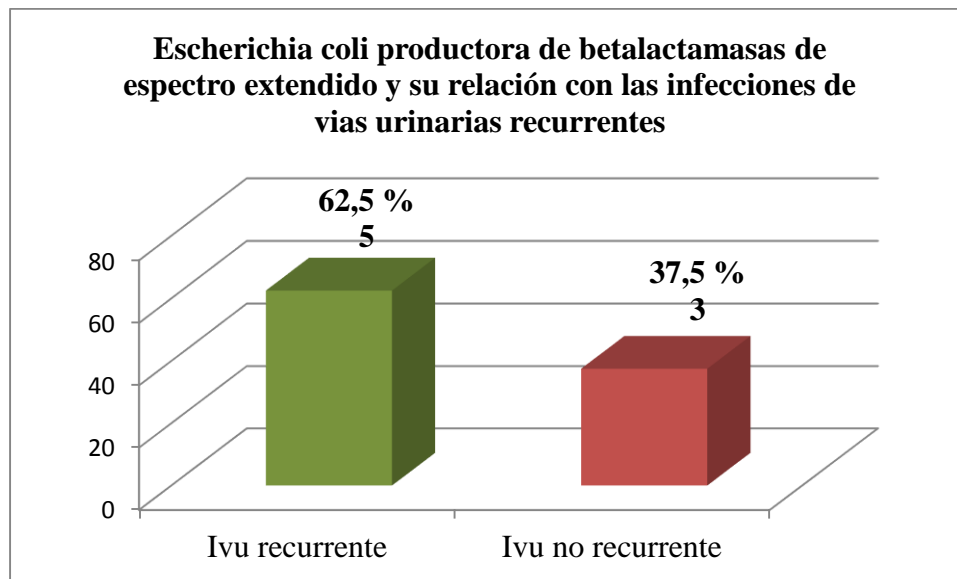
En la investigación realizada la población más propensa a la infección de vías urinarias por *Escherichia coli* BLEE está comprendido en el grupo etario de 32 años en adelante con 5 casos y un porcentaje del 62,5 %; se observaron otros estudios como el realizado en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión de Perú en el 2012 *Escherichia coli* BLEE afectó mayoritariamente al grupo etario que comprende desde los 16 años hasta los 65 años de edad. (Tejada et al., 2012)

**TABLA N° 5. *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido y su relación con las infecciones de vías urinarias recurrente.**

<i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE		
IVU	Frecuencia	Porcentaje
IVU recurrente	5	62,5
IVU no recurrente	3	37,5
Total	8	100

Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

**GRÁFICO N° 5**



Fuente: Registros de investigación.  
Elaborado por: Pablo Villavicencio

**Interpretación:**

Los usuarios que presentaron infecciones de vías urinarias recurrentes con *Escherichia coli* productora de BLEE fue del 62,5 % con 5 casos, mientras que los usuarios que presentaron *Escherichia coli* productora de BLEE sin IVU recurrente fue tan solo el 37,5 % con un total de 3 casos representando un porcentaje significativo relacionado al estudio realizado en la ciudad de Quito en el Hospital Carlos Andrade Marín en el año 2014, en el que en el 48,1 % de las personas que tuvieron IVU recurrente se aisló bacterias productoras de BLEE (Merino, 2014)

## **g. DISCUSIÓN**

Las infección de vías urinarias se define como la invasión, multiplicación y colonización del tracto urinario causada en su mayor parte por microorganismos de origen intestinal, como *Escherichia coli* y otras Enterobacterias que pueden llegar a las vías urinarias y producir infección. Algunos microorganismos causantes de este tipo de infecciones manifiestan el fenómeno de resistencia a través de diversos mecanismos, siendo uno de estos la producción de enzimas tipo betalactamasas de espectro extendido (BLEE), existiendo en la actualidad un incremento de estas cepas bacterianas en pacientes ambulatorios con infección de vías urinarias, en la cual la prevalencia de resistencia de *Escherichia coli* productora de BLEE varía dependiendo de la población, país o región donde se realiza el estudio. (Grabe, 2010; Merino, 2015)

La presente investigación se la realizó con un total de 233 urocultivos de usuarios provenientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora durante el periodo de Abril-Junio del 2015, del crecimiento bacteriano de 70 muestras de orina según los criterios de inclusión se obtuvo el aislamiento de *Escherichia coli* en 56 muestras, de las cuales 8 cepas correspondiente al 14,29% fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); para el tamizaje y confirmación de BLEE se utilizó el método de difusión con especificaciones seguidas en el manual del CLSI M100-S24. Todos los aislamientos realizados de *Escherichia coli* productora de BLEE fueron provenientes de usuarios del género femenino, afectando con mayor porcentaje a la edad comprendida entre los 32 años en adelante, mientras que la relación entre IVU recurrente y *Escherichia coli* productora de BLEE tuvo un porcentaje del 62,5 %.

En un estudio realizado en el centro Médico Dr. Ignacio Chávez, Hospital San José y en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, de la ciudad de Hermosilla, de México en el año 2012, obtuvieron una prevalencia del 15,5% de *Escherichia coli* productora de BLEE de pacientes ambulatorios, donde aplicaron en 767 aislamientos de *Escherichia coli* el método de sinergia de doble disco con y sin ácido clavulánico, coincidiendo con la prevalencia de nuestra localidad de 14.29 %, la cual es similar a los datos mencionados en este estudio. (García, 2011)

En la ciudad de Quito en el Hospital Carlos Andrade Marín se realizó el estudio de “Prevalencia de *Escherichia coli* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), utilizando los



criterios para pruebas de susceptibilidad bacteriana del CLSI, M 100-S23, en urocultivos de pacientes no hospitalizados”, en el año 2014 la prevalencia de *Escherichia coli* productora de BLEE fue del 25,5%; utilizando el mismo método de detección y confirmación del manual del CLSI en urocultivos de pacientes ambulatorios, observándose una prevalencia menor en la ciudad de Loja en cuanto a *Escherichia coli* productora de BLEE según datos de la presente investigación. (Merino, 2015)

En la investigación realizada en el Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión de Callao-Perú, presentó un 71,1 % de *Escherichia coli* productora de BLEE en el sexo femenino; cuya edad más afectada fue la comprendida entre los 45 años en adelante con un 53,1 %, datos que se encuentran relacionados con este estudio el cual presentó 8 cepas de *Escherichia coli* productora de BLEE aisladas todas del sexo femenino con un porcentaje del 100 %, donde la edad más afectada fue el grupo etario comprendido desde los 32 años en adelante con el 62,5 %. Estos datos corroboran que la población más propensa adquirir la infección por *Escherichia coli* productora de BLEE es el sexo femenino, siendo las mujeres mayores a 32 años el grupo más propenso adquirir infección de vías urinarias según los datos obtenidos en este estudio. (Tejada et al., 2012)

También se evaluó la asociación entre IVU recurrente y *Escherichia coli* productora de BLEE en pacientes ambulatorios, donde se concluyó que si existe relación con un 62,5%, similar a otros estudios como el realizado en el Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito en el año 2014 que presentó 48,1 % de asociación entre IVU recurrente y *Escherichia coli* productora de BLEE (Merino, 2015)

#### **h. CONCLUSIONES:**

- La prevalencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido es del 14,29 % lo que indica que existen cepas que causan infecciones en la comunidad y que deberían tener un tratamiento cuidadoso frente al germen por su resistencia a todos los betalactámicos y monobactámicos.
- *Escherichia coli* productora de BLEE afecta con mayor frecuencia al sexo femenino entre la edad comprendida de 32 años en adelante con el 62,5 %, debido a que las mujeres son más propensas adquirir infecciones de vías urinarias por las condiciones fisiológicas que presentan.
- Al relacionar los resultados positivos de *Escherichia coli* productora de BLEE con los usuarios que tuvieron una infección de vías urinarias recurrente (IVU) se puede concluir que si existe asociación entre la aparición de *Escherichia coli* productora de BLEE e IVU recurrente.

## **i. RECOMENDACIONES:**

- Se recomienda al personal de laboratorio de Bacteriología estandarizar el protocolo establecido en el manual del CLSI M100 S-24, para que todo el personal que trabaja en la institución adopte el mismo proceso de tamizaje y confirmación de BLEE.
- Se recomienda elaborar nuevas investigaciones que ayuden a complementar los datos de vigilancia epidemiológica acerca de la resistencia bacteriana como es el caso de *Escherichia coli* productora de BLEE ya que es un problema de salud en ascenso y de gran impacto en la comunidad.

## j. BIBLIOGRAFIA

Alarcón, B., Obregón, M., & Suárez, A. (2011). *Frecuencia de Escherichia coli betalactamasas de espectro extendido en la flora intestinal de menores de cinco años que son atendidos en los centros de salud del cantón Cuenca, Junio - Septiembre, 2011*. Repositorio institucional Universidad de Cuenca Sitio web: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4324>

Alvarado, S., Guzmán, F., & Saquipay, W. (2011). *Caracterización y resistencia de Escherichia coli a los antimicrobianos en los hospitales Vicente Corral Moscoso y José Carrasco Arteaga*. Repositorio digital de la Universidad de Cuenca Sitio web: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3816/1/TECL10.pdf>

Avendaño, L. (2008). *Nefrología Clínica*. España: Editorial Medica Panamericana S.A.

Azuero, L. (2013). *Sensibilidad antimicrobiana de Escherichia coli en pacientes con infecciones de vías urinarias que acuden al hospital IESS en el periodo de Diciembre 2012-Febrero-2013*. Repositorio Digital Universidad Nacional de Loja. Sitio web: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/7003>

Britanialab. *E.M.B. Agar.* Sitio: web  
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm>

Britania. *Agar MacConkey.* Sitio web:  
[http://www.britanialab.com/productos/302\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/302_hoja_tecnica_es.pdf)

Britania. *Agar Sangre.* Sitio web:  
[http://www.britanialab.com/productos/236\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/236_hoja_tecnica_es.pdf)

Britanialab. *Lisina Hierro Agar.* Sitio: web  
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>

Calderón, E., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., Landa, S., Moreno, S., Rodríguez, F., Simón, S., & Valdez, R. (2013). *Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados*. Agosto 01, 2013, de SCielo. Sitio web: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462013000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000100003)

Camacho, E. (2013). *Presencia de bacterias causantes de infección de vías urinarias en mujeres del sector urbano y rural que acuden al Hospital del IESS de Cariamanga, Noviembre 2012 - abril 2013*. Repositorio digital de la Universidad Nacional de Loja Sitio web: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/4011>

Chiriboga, M., & Araujo, C. (2012). *Nuevo método alternativo para la detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en Escherichia coli y Klebsiella spp.* Repositorio digital de la Universidad Central del Ecuador. Sitio web: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/644>

CONASA. (2014) *Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos 9na Revisión*. Sitio web: [http://www.conasa.gob.ec/index.php?option=com\\_content&view=article&id=348:cnmb-9na&catid=36:boletines](http://www.conasa.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=348:cnmb-9na&catid=36:boletines)

Echeverría, J., Sarmiento, E. & Osore, F. (2006). *Infección del tracto urinario y manejo antibiótico*. Documento de SCielo Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a06v23n1>

Evangelina Olivas. (2004). *Manual de prácticas de Microbiología I, II y Parasitología*. México: Universidad autónoma de la ciudad Juárez

Facultad de Ciencia Médicas. (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. Sitio web: <http://www.reactgroup.org/uploads/react/resources/854/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>

Faleiro, P. (2010). *Formación de biopelículas por “Escherichia coli” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas*. (Tesis doctoral). Facultad de farmacia. Universidad complutense de Madrid, de Repositorio digital. Sitio web: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>

García, A., García, E., Hernández, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J., & Gómez, J. (2011). *Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales*. Sitio web: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/24/2/garcia.pdf>

García, M. (2013). *Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia.* Septiembre 19, 2013, de SCielo Sitio web: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1887-85712013000400003&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1887-85712013000400003&script=sci_arttext)

Jawetz, Melnick & Adelberg. (2011). *Microbiología Médica.* México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.

Méndez, E., & Peralta, J. (2010). *Determinación de la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en capas de Escherichia coli aisladas de muestras de orina de pacientes de la Fundación Pablo Jaramillo.* 2010, de Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. Sitio web: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2436>

Michay, A. (2012). *Determinación de la susceptibilidad antibiótica de Escherichia coli en urocultivos realizados en el Hospital Regional Isidro Ayora de la Ciudad de Loja, periodo enero - junio del 2012.* Repositorio Digital Universidad Nacional de Loja. Sitio web: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5676>

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. & Ochoa, T. (2011). *Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea.* Noviembre 9, 2011, de SCielo Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

Paladines, D. (2013). *Infecciones bacterianas del tracto genito urinario en mujeres gestantes atendidas en la Clínica Julia Esther González de la ciudad de Loja. Periodo Julio – Septiembre 2012.* Repositorio digital de la Universidad Nacional de Loja Sitio web: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/4001>

Paredes, F. & Roca, J. (2004). *Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana.* De Elsevier Sitio web: [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=13059414&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf&ty=144&accion=L&origen=doy mafarma&](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf&ty=144&accion=L&origen=doy mafarma&)

Pérez J & Robles A. (2013). *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana.* Mayo 01, 2013, de ResearchGate. Sitio web:

[http://www.researchgate.net/publication/242406321\\_Aspectos\\_basicos\\_de\\_los\\_mecanismos\\_de\\_resistencia\\_bacteriana](http://www.researchgate.net/publication/242406321_Aspectos_basicos_de_los_mecanismos_de_resistencia_bacteriana)

Preparadores de oposiciones a la enseñanza. *Procedimientos de identificación bacteriana. Sistemas manuales y automáticos. Últimas tendencias en identificación.* Sitio web: <http://www.preparadores.eu/temamuestra/PTecnicos/Diagnostico.pdf>

Pigrau, C. (2013). *Infección del tracto urinario.* Diciembre 7, 2011. Sitio web: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>

Puerta, A. & Rodríguez, F. (2010). *Enterobacterias.* De Facmed Sitio web: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf)

Reyes, J.(2013). *Mujeres con diabetes mayor riesgo de infecciones urinarias,* de Salud 180 Sitio web: <http://bienestar.salud180.com/sexualidad/mujeres-con-diabetes-mayor-riesgo-de-infecciones-urinarias>

Riera, A., Maroto, A. & Sitjar, T. (2014). *Infecciones del tracto urinario. El papel del fármaco.* Abril, de Farmacia comunitaria Sitio web: <http://www.auladelafarmacia.com/resources/files/2014/6/26/140378820318931-36%20FARMACIA%20COMUNITA.pdf>

Salgado, M. (2008). *Examen de Orina.* Sitio web: [http://www.cobituc.org.ar/2008/descargas/Salgado\\_Examen\\_de\\_Orina\\_Jul2010\\_Alumnos.pdf](http://www.cobituc.org.ar/2008/descargas/Salgado_Examen_de_Orina_Jul2010_Alumnos.pdf)

Secretaria Distrital de Salud. (2010). *Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI m100-s20 2010.* Abril 4, 2011, de GREBO Sitio web: [http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual\\_Resistencia\\_SDS\\_2010.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf)

Seral, C., Pardos, M., & Castillo, F. (2010). *Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella.* Enero, 2010, de ELSEVIER Sitio web: <http://zl.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28/betalactamasas>

espectro-extendido-enterobacterias-distintas-escherichia-coli-13148309-programa-externo-control-calidad-seimc-a%C3%B1o-2008-2010.

Tumbaco, A. & Martínez, L. (2013). *Factores de riesgo que influyen en la predisposición de infecciones urinarias en mujeres 15 – 49 años que acuden al Subcentro Virgen del Carmen del cantón La Libertad 2012-2013*. Repositorio de la UPSE Sitio web: <http://repositorio.upse.edu.ec:8080/bitstream/123456789/1003/1/TESIS%20INFECCIONES%20%20URINARIAS.pdf>

Velasco, J. Araque, M. Araujo, E. Longa, A. Nieves, E. Ramírez, A. Sánchez, K., & Velazco, E. (2008). *Manual práctico de bacteriología clínica*. 2011, de Codepre. Sitio web: <http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf>



**k. ANEXOS**

**ANEXO N° 1**

Loja, 03 de Febrero de 2015

Ing. Byron Guerrero

**GERENTE DEL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA**

Cuidad.-

De mis consideraciones:

Yo, Pablo Andrés Villavicencio Pacheco, portador de la cédula de identidad número 1104811334, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente, deseándole un cordial saludo, y a la vez solicitarle muy comedidamente por su intermedio se me autorice el permiso correspondiente para la realización de la parte práctica del proyecto de tesis titulado "ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA", lo cual implica la recolección de muestras de orina, con el fin de poder cumplir los objetivos planteados en la investigación.

En espera de ser atendida en la forma más favorable y oportuna, me anticipo en expresar mis sentidos reconocimientos.

Atentamente.



Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

ESTUDIANTE

  
HOSPITAL GENERAL  
ISIDRO AYORA  
**RECIBIDO**  
Loja a. 03/02/15 Hora 9:04  
Firma: JRM  
SECRETARIA DE GERENCIA



HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA  
GERENCIA

Of. N° 0190-02-2015-SDG-HIAL  
Loja, 03 de Febrero de 2015.

Señor  
Pablo Andrés Villavicencio Pacheco  
**Estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico**  
Ciudad.-

De mi consideración:

Me permito informar que autorizo la realización para el desarrollo de la práctica del proyecto de tesis titulado *ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA* de esta Casa de Salud.

Con sentimientos de consideración y estima.

Atentamente,

Ing. Byron Guerrero Jaramillo  
**GERENTE DEL HOSPITAL ISIDRO AYORA**  
BG/jr  
C/c. Lic. Angel Luzón Coordinador de Laboratorio Clínico



ACCIÓN	APELLIDOS Y NOMBRES	CÉDULA DE CIUDADANÍA	FECHA	HORA	FIRMA
RECIBIDO POR:	Villavicencio Pacheco Pablo	1104811334	04/02/15	08:00	

**ANEXO N° 2**

Loja, 03 de Febrero de 2015

Lic. Ángel Luzón

**RESPONSABLE DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA**

Cuidad.-

De mis consideraciones:

Yo, Pablo Andrés Villavicencio Pacheco, portador de la cédula de identidad número 1104811334, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, por medio del presente me dirijo muy respetuosamente, deseándole un cordial saludo, y a la vez solicitarle muy comedidamente por su intermedio se me autorice el permiso correspondiente para la realización de la parte práctica del proyecto de tesis titulado "ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA", lo cual implica la recolección de muestras de orina, con el fin de poder cumplir los objetivos planteados en la investigación.

En espera de ser atendida en la forma más favorable y oportuna, me anticipo en expresarle mis sentidos reconocimientos.


Atentamente.

 Ministerio de Salud Pública

HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA  
Pablo Andrés Villavicencio Pacheco


**RECIBIDO** ESTUDIANTE

Loja a 03/02/15. Hora 9:04

Firma:  JRM  
SECRETARIA DE GERENCIA



*Autorizado siempre  
y cuando tengas sus  
propios insumos y reactivos  
no interfiera con las  
labores y se apege a  
las normas institucionales*





### ANEXO N° 3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
ÁREA DE LA SALUD HUMANA  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO  
ENCUESTA

**Encargado:** Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

**Código:**.....

En pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente, procederé a llenar las siguientes preguntas:

**1. ¿A lo largo de su vida ha presentado infección de vías urinarias?**

Si ( )

No ( )

**2. ¿Cuántas veces ha presentado infección de vías urinarias en el último año?**

1 vez ( )

2 veces ( )

3 veces ( )

4 veces o más ( )

.....

Firma

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN



## ANEXO N° 4



### AGAR SANGRE DE CORDERO Medio de cultivo Agar Sangre de Cordero

#### INTRODUCCIÓN:

Es un medio de cultivo enriquecido preparado para la recuperación y aislamiento de toda clase de microorganismos gram-positivos y gram-negativos incluyendo aquellos de crecimiento exigente como *Haemophilus spp* y *Listeria*. El medio ha sido adicionado con sangre de cordero con el fin de establecer en los microorganismos características de hemólisis (alfa, beta ó gamma) que puedan ayudar a su identificación.

#### COMPONENTES

1. Funda por 10 unidades
2. Inserto

#### MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS:

1. Asas Bacteriológicas
2. Guantes Estériles
3. Tapa bocas
4. Estufa a 37°C
5. Mechero de Bunsen.

#### METODOLOGÍA:

**Principio del método:** El agar sangre garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia clínica tanto gram-positivos como gram-negativos, hongos y levaduras, pudiendo observarse en este medio las características de hemólisis que algunos de ellos presentan sirviendo esto como base inicial para la correcta identificación del patógeno. El Agar sangre de cordero se prepara a partir de la base agar triplicasa de soya (que contiene caseína digerida con enzimas pancreáticas 5.0 g, caseína digerida con papaína 5.0 g, Cloruro de Na 5.0 g, Agar 15.0 g. Y se adiciona 5% de sangre de cordero.

#### CRITERIOS DE DESEMPEÑO Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

Por ser el Agar sangre de cordero un medio enriquecido permitirá el crecimiento de bacterias tanto patógenas como saprofitas, por lo que es importante que el bacteriólogo determine de acuerdo al tipo de muestra que se esté analizando que clase de microorganismos es importante aislar e identificar, para garantizar el diagnóstico correcto, así mismo es importante trabajar con las mayores condiciones de asepsia para garantizar que no hay crecimiento de microorganismos contaminantes que puedan ocasionar un diagnóstico erróneo.

#### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

La placa de agar sangre de cordero viene lista para ser utilizada.

#### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

El medio agar sangre de cordero debe ser colocada las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio. Este producto debe manipularse con cuidado evitando movimientos bruscos o caídas que puedan resquebrajar la capa del medio.

De acuerdo al estudio (Condiciones de Almacenamiento de los Medios) realizados por Medibac Lab. Los medios de cultivos preparados para su transportación tienen una tolerancia de hasta 24 horas con una temperatura de 2 a 35°C, una vez llegado a su destino final el mismo debe ser almacenado a una temperatura de 4 a 8°C.

**Nota:** El producto debe evitar temperaturas inferiores a -0°C para evitar congelación del medio, lo que ocasionaría el deterioro del mismo, y evitar temperaturas superiores a 35°C para que no produzca condensación interna en la placa lo que podría afectar la fidelidad de los resultados.

Conservado en condiciones óptimas el medio es estable hasta la fecha de expiración señalada.

#### PROCEDIMIENTO:

Cualquier muestra clínica puede ser procesada en este medio

- 1- Con asa bacteriológica estéril trabajando siempre a la llama del mechero, tomar una mínima muestra.
2. Sembrar suavemente sobre la superficie tersa del medio por el procedimiento de agotamiento.
3. Incubar las placas en posición invertida a 37°C en aerobiosis ó atmósfera de CO<sub>2</sub>.
4. Al término de 18-24 horas de incubación examinar el cultivo y determinar los estudios a seguir según las características de las colonias y el tipo de hemólisis observada.

**Nota:** Para muestras en las que se sospecha presencia de *Streptococcus* del Grupo A, realizar siembra en profundidad para evidenciar mejor la β hemólisis





**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ANALÍTICOS:**

Es importante que para la interpretación de resultados analíticos, realice una correlación con los demás medios sembrados y haga una coloración de Gram sobre las colonias importantes si se trata de muestras que pueden tener flora acompañante. En el caso de líquidos estériles es importante identificar y aislar cualquier tipo de microorganismo; para la lectura de hemólisis observe:

- A. Colonias con un halo transparente alrededor de estas: microorganismo beta-hemolítico.
- B. Colonias con un halo color verdoso alrededor de estas: microorganismo alfa-hemolítico.
- C. Colonias sin hemólisis: microorganismo gamma-hemolítico.

**CONTROL DE CALIDAD:**

El Agar Sangre de Cordero tiene un estricto control de calidad a lo largo del proceso de producción. El producto final tiene un cuidadoso control para asegurar que cada lote llene las especificaciones del medio: Color, consistencia, tersura, esterilidad, pH.

ASPECTOS FÍSICOS DEL MEDIO		ESTADO
Apariencia	Medio sólido de color rojo brillante envasado en placa de petri.	CUMPLE
Color del medio sólido	Rojo brillante	CUMPLE
pH	6,98 - 7,3	7,2
Consistencia	La consistencia del medio debe ser ligeramente dura, para que permita la siembra de muestras sin romperse.	CUMPLE
Volumen del medio	23cc que deben dar con una capa de 4 - 5 mm de agar en placa de petri.	4,7 mm
Tersura	El medio debe ser completamente liso, no debe presentar rugosidad ni burbujas que dificulten la siembra.	CUMPLE
Esterilidad	El medio antes de usarse debe encontrarse libre de cualquier crecimiento microbiano	CUMPLE

El desempeño del medio se controla mediante el cultivo de cepas control ATCC de:

- Escherichia coli* 25922
- Streptococcus pyogenes* 19615
- Streptococcus pneumoniae* 6305
- Enterococcus faecalis* 29212

Para determinar calidad y características del crecimiento bacteriano que deben observarse en el medio.

**VALOR DE REFERENCIA:**

Este medio al usarse, debe ser estéril y permitir un desarrollo óptimo de las cepas de referencia.

**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

Ya que para la utilización de este medio se deben manipular muestras clínicas y microorganismos patógenos, se deben guardar las más estrictas normas de asepsia y antisepsia, los cultivos una vez leídos deben esterilizarse y luego colocarse en bolsa roja identificada y entregada a la compañía especializada en recolección de productos biológicos de desecho.

Laboratorio Fabricante: Medibac  
Química Responsable: Dra. Juana Cedeño Vélez.

## ANEXO N° 5

### AGAR MACCONKEY

#### Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. (Britanialab, 2011)

#### Uso

El Agar MacConkey se recomienda para el aislamiento selectivo de *Escherichia coli*. También se recomienda para el aislamiento y diferenciación de fermentación la lactosa y no fermentación de lactosa de bacterias entéricas. (Himedia, 2011)

#### Composición (en gramos por litro)

Peptonas (carne y caseína)	3.000
Tejido Pancreático de gelatina	17.000
Lactosa monohidrato	10.000
Sales biliares	1.500
Cloruro de sodio	5.000
Cristal violeta	0.001
Neutral rojo	0.030
Agar	13.500

pH final (a 25 ° C)  $7,1 \pm 0,2$  (Himedia, 2011)

### **Instrucciones**

Suspender 49,53 gramos de medio deshidratado en 1000 ml / agua destilada purificada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Evitar el sobrecalentamiento.

Enfriar a 45-50 ° C. Mezclar bien antes de verter en placas de Petri estériles. La superficie del medio debe estar seca cuando se inocula. (Himedia, 2011)

### **Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 ° C en un recipiente bien cerrado y en el medio preparado a 2 – 8 ° C. Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)



## ANEXO N° 6

### AGAR MUELLER HINTON

#### Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. (Britanialab, 2011)

#### Uso

Mueller Hinton se utiliza para las pruebas de sensibilidad de las bacterias comunes que crecen rápidamente utilizando discos de antimicrobianos por el método de Bauer-Kirby. Contiene niveles bajos de timina, timidina, calcio y magnesio. (Himedia, 2011)

#### Composición (en gramos por litro)

Caseína hidrolizado ácido	17.500
Infusión cerebro corazón	2.000
Almidón, soluble	1.500
Agar	17.000
PH final (a 25 ° C)	7,3 ± 0,2 (Himedia, 2011)

**Instrucciones**

Suspender 38 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Mezclar bien y distribuir en cajas estériles. (Himedia, 2011)

**Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 ° C en un recipiente bien cerrado y en el medio preparado a 2-8 °C. Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)

## ANEXO N° 7

### AGAR TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

#### Fundamento:

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones  $Fe^{3+}$ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. (Britanialab, 2011)

#### Uso

Triple Azúcar Hierro Agar se utiliza para la identificación de bacilos entéricos gram-negativo sobre la base de dextrosa, lactosa y la fermentación de sacarosa y la producción de sulfuro de hidrógeno. (Himedia, 2011)

#### Composición (en gramos por litro)

Peptona	20.000
Extracto de carne	3.000
Lactosa	10.000
Sacarosa	10.000
Dextrosa	1.000
Cloruro de sodio	5.000

Sulfato ferroso, heptahidrato	0.200
Tiosulfato de sodio, pentahidratado	0.300
Rojo fenol	0.024
Agar	12.000
PH final (a 25 ° C)	7,4 ± 0,2 (Himedia, 2011)

### **Instrucciones**

Suspender 64,32 gramos (el peso equivalente de medios deshidratados por litro) en 1000 ml de agua destilada. Caliente a ebullición hasta disolver el medio completamente. Mezclar bien y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos. Distribuir en tubos de ensayo y dejar el medio en forma inclinada con la base de aproximadamente 1 pulgada de largo. (Himedia, 2011)

### **Interpretación**

Observar el color del medio de cultivo y la producción de gas.

- 1- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- 2- Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- 3- Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- 4- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas. (Britanialab. 2010)
- 5- Negro presente- precipitado H<sub>2</sub>S: producción de gas (Himedia, 2011)

### **Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 °C en un recipiente bien cerrado y en el medio preparado a 2 – 8 °C. Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)

## ANEXO N° 8

### AGAR SIMMONS CITRATO

#### Fundamento

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico simple que se encuentra como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía de fuentes distintas de fermentación de los hidratos de carbono, con el citrato como única fuente de carbono. La medición de esta característica es importante para identificar muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Cualquier medio usado para detectar la utilización del citrato por las bacterias que se van a probar debe carecer de proteínas e hidratos de carbono como fuente de carbono.

La utilización de citrato por la bacteria que se va a probar se detecta en el medio de citrato por la producción de subproductos alcalinos. El medio contiene citrato de sodio, que es un anión, como única fuente de carbono, y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoniaco ( $\text{NH}^+$ ), lo que produce la alcalinización del medio por conversión del  $\text{NH}^{2+}$ , a hidróxido de amonio ( $\text{NH}^4\text{OH}$ ). El indicador es el azul de bromotimol, que es amarillo debajo de pH 6 y azul por encima de pH 7,6. (Koneman, 2008)

#### Uso

El Agar Simmons Citrato se utiliza para la diferenciación entre coli fecales y los miembros del grupo aerógenos, sobre la base de la utilización de citrato. (Himedia, 2011)

#### Composición (gramos por litro)

Dihidrógeno fosfato de amonio	1.000
Sulfato de magnesio	0.200
Fosfato dipotásico	1.000
Citrato de sodio	2.000

Cloruro de sodio	5.000
Bromo timol azul	0.080
Agar	15.000
pH final (a 25 ° C)	6,8 ± 0,1 (Himedia, 2011)

### **Instrucciones:**

Suspender 24,28 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Mezclar bien y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Distribuir en tubos y dejar enfriar de forma inclinada. (Himedia 2011)

### **Interpretación**

La prueba positiva está representada por la producción de color azul oscuro en el término de 24 a 48 horas, que indica que el microorganismo en prueba ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con la formación de productos alcalinos. La prueba también puede considerarse positiva sin que haya color azul, si hay desarrollo visible en la estría de siembra. (Koneman, 2008)

### **Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 ° C en un recipiente bien cerrado el medio preparado a 2 - 8 ° C. Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)

## ANEXO N° 9

### UREA AGAR BASE (CHRISTENSEN)

#### Fundamento

La urea es una diamida del ácido carbónico. Todas las amidas se hidrolizan fácilmente, con la liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que tienen muchas especies de microorganismos que pueden hidrolizar la urea. El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio, lo que produce alcalinización y aumenta el pH del medio. (Koneman, 2008)

#### Uso

Agar Urea Base con la adición de urea solución se recomienda para la detección de la producción de ureasa, particularmente por los miembros del género *Proteus*. (Himedia, 2011)

#### Composición (gramos por litro)

Tejido Péptica animal	1.000
Dextrosa	1.000
Cloruro de sodio	5.000
Fosfato disódico	1.200
Fosfato monopotásico	0.800
Rojo fenol	0.012
Agar	15.000
pH final (a 25 ° C)	6,8 ± 0,2 (Himedia, 2011)

**Instrucciones:**

Suspender 24,01 gramos en 950 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (115 ° C) durante 20 minutos. Enfriar a 50 ° C y añadir asépticamente 50 ml estéril de 40% solución de urea y mezclar bien. Distribuir en tubos estériles y permitir fijar en la posición inclinada. No sobrecalentar o recalentar el medio como la urea se descompone con mucha facilidad. (Himedia, 2011)

**Interpretación**

Degradadores rápidos de la urea (especies de *Proteus*): color rojo en todo el medio.

Degradadores lentos de la urea (especies de *Klebsiella*): inicialmente color rojo solo en el pico de flauta, que gradualmente se extiende a todo el tubo. (Koneman, 2008)



## ANEXO N° 10

### AGAR LISINA HIERRO

#### Fundamento

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El púrpura de bromocresol, es el indicador de pH, de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada. Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. (Britanialab, 2011)

#### Uso

Lisina Hierro Agar se recomienda para la diferenciación de microorganismos entéricos especialmente *Salmonella arizonae* basada en su capacidad de descarboxilar o desaminar la lisina y para formar sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). (Himedia, 2011)

#### Composición (en gramos por litro)

Tejido péptico de animal	5.000
Extracto de levadura	3.000
Dextrosa	1.000
L-lisina	10.000

Citrato de amonio férrico	0.500
Tiosulfato de sodio	0.040
Bromocresol púrpura	0.020
Agar	15.000
pH final (a 25 ° C)	6,7 ± 0,2 (Himedia, 2011)

### **Instrucciones**

Suspender 34,56 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Distribuir en tubos de ensayo y enfriar los tubos en posición inclinada para formar tubos inclinados. (Himedia, 2011)

### **Interpretación**

Descarboxilación de la lisina:

Prueba Positiva: Pico violeta/fondo violeta.

Prueba Negativa: Pico violeta/fondo amarillo.

Producción de ácido sulfhídrico:

Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo). (Britanialab)

### **Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 °C en un recipiente bien cerrado y en el medio preparado a 2 - 8 °C. Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)

## ANEXO N° 11

### AGAR MOTILIDAD SIM

#### Fundamento:

Medio de cultivo en el cual la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Ehrlich o de Kovacs, para originar un compuesto de color rojo. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro. El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio. (Koneman, 2008)

#### Uso

El medio SIM se recomienda para la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad de los bacilos entéricos. (Himedia, 2011)

#### Composición (en gramos por litro)

Pancreático digestión de la caseína	20.000
Tejido péptico de animal	6.100
Sulfato de amonio ferroso	0.200
El tiosulfato de sodio	0.200
Agar	3.500
pH final (a 25 ° C)	7,3 ± 0,2 (Himedia, 2011)

## **Instrucciones**

Suspender 30,0 gramos en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 ° C) durante 15 minutos. Dispensar en tubos de ensayo y permitir que los tubos se enfríen en posición vertical. (Himedia, 2011)

## **Interpretación**

Observar la movilidad y el color del medio de cultivo. Luego realizar la prueba de indol.

- Movilidad:

Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.

Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.

- Producción de SH<sub>2</sub>:

Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Resultado negativo: el medio permanece sin cambio de color.

- Prueba del indol: Agregar al medio de cultivo 3 a 5 gotas de Indol Reactivo.

Resultado positivo: color rojo.

Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

(Britanialab, 2010)

## **Almacenamiento y caducidad**

Almacenar por debajo de 30 °C en un recipiente bien cerrado y en el medio preparado a 2-8 °C.

Usar antes de la fecha de caducidad en la etiqueta. (Himedia, 2011)

## ANEXO N° 12

### REACTIVO DE KOVACS

#### Principio

El indol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y diseminar el triptófano, con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, la particular utilidad en la diferenciación de *Escherichia coli* (positiva) de los miembros del grupo de *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (la mayoría negativas)

La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del *p*-dimetilaminobenzaldehído. Éste es el procedimiento químico activo de los reactivos de Kovacs y de Ehrlich. Debe utilizarse un medio rico en triptófano. En la práctica se utilizan medios combinados, como el medio de sulfuro de indol para motilidad (SIM), el medio para motilidad indol ornitina (MIO) o el medio indol nitrato. Las pruebas rápidas en mancha, utilizando tiras de papel de filtro impregnado con el reactivo *p*-dimetilaminocinnamalaldehído, son útiles para la detección sistémica de bacterias que producen indol con rapidez. (Koneman, 2011)

#### Composición

Para-dimetil-amino-Benzaldehído	1 g
Alcohol amílico o butílico	80 mL
Ácido clorhídrico químicamente puro	20 mL

#### Preparación:

- Disolver el para-dimetil-amino-benzaldehído en alcohol butílico o amílico.
- Añadir el ácido clorhídrico.
- Conservar en un frasco ámbar con tapón de vidrio, en sitio oscuro.

- Se sugiere que la solución se refrigere.

**NOTA:** El reactivo debe tener una coloración amarillo claro o café claro.

### **Procedimiento**

Agregar 3 a 5 gotas de reactivo Indol a un cultivo puro de 24-48 horas del microorganismo en estudio en el medio de cultivo SIM y agitar con suavidad. (Britanialab, 2011)

### **Interpretación de los resultados**

Observar el color desarrollado al agregar el reactivo revelador:

Positivo: color rojo en la interface del reactivo y el medio de cultivo.

Negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento. (Britanialab, 2011)

## ANEXO N° 13

### PROTOCOLO PARA ACTIVACIÓN DE CEPAS DE CONTROL

#### *Klebsiella pneumoniae 700603*

1. Abrir el vial por la mitad.
2. Colocar de 0,5 a 1,0 ml de caldo nutritivo preparado en el vial con una pipeta Pasteur y agitar.
3. Llevar el vial a la incubadora durante 30 minutos.
4. Luego de la incubación, proceder a sembrar por agotamiento en agar nutritivo y dejar incubar durante 24 horas.
5. A las 24 horas de incubación se procede hacer un pase en agar sangre de cordero y en agar MacConkey. Se obtiene cepas aisladas para el control de calidad y se procede a realizar las pruebas piloto.

#### *Escherichia coli 25922*

1. Abrir el vial por la mitad.
2. Colocar de 0,5 a 1,0 ml de caldo tripticasa de soya preparado en el vial con una pipeta Pasteur y agitar.
3. Llevar el vial a la incubadora y dejar incubar 30 minutos.
4. Luego de la incubación, proceder a sembrar por agotamiento en agar tripticasa de soya y dejar incubar durante 24 horas.
5. A las 24 horas de incubación se procede hacer un pase en agar sangre de cordero y en agar MacConkey. Se obtiene cepas aisladas para el control de calidad y se procede a realizar las pruebas piloto.

## ANEXO N° 14

### PROTOCOLO PARA CONSERVACIÓN DE CEPAS DE CONTROL

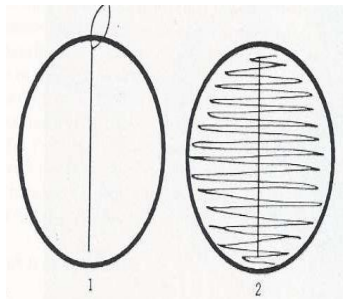
1. Se esterilizó todo el material que se va a utilizar para la conservación: tubos, alícuotas con 500 ul de glicerina, pipeta, hisopos, caldo nutritivo, caldo tripticasa de soya.
2. Se coloca en un tubo estéril una cantidad de 8 ml de caldo nutritivo para *Klebsiella pneumoniae* 700603 y en otro tubo la misma cantidad de caldo tripticasa de soya para *Escherichia coli* 25922.
3. De las cepas crecidas en el Agar Sangre de Cordero y MacConkey se procede a coger colonias y se realiza la escala de McFarland con el caldo nutritivo para *Klebsiella pneumoniae* 700603 y caldo tripticasa de soya para *Escherichia coli* 25922, dándonos una cantidad de 1 en el escala.
4. Se coloca en las alícuotas con 500 ul de glicerina, 500 ul de la escala de McFarland, se cierran las alícuotas y se procede a rotular cada una de las alícuotas.
5. Llevar las alícuotas en una gradilla para mantenerlas en refrigeración a una temperatura de -80° C para su posterior utilización en el control de calidad de la investigación.



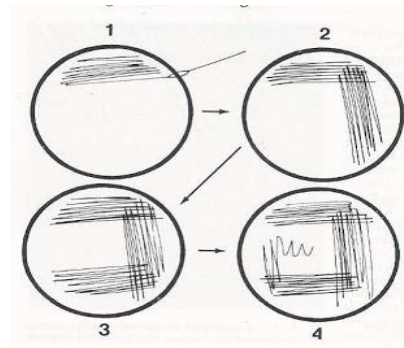
## ANEXO N° 15

### TECNICA DE DILUCION CON ASA CALIBRADA

1. En la orina no centrifugada previamente homogenizada se introduce el asa calibrada y se la extrae evitando salpicar en superficies.
2. Se toma un asada de orina con el asa calibrada de 0.001 ml, y se siembra en una caja de agar sangre de cordero y MacConkey, estriando uniformemente.



Estriado en agar Sangre de Cordero



Estriado en agar MacConkey

3. Todas las cajas se incuban a 37° C durante un periodo de 24 a 48 horas.
4. Se procede a contar las colonias que se encuentran en la caja
5. En cada caso, el número de colonias es equivalente al número de bacterias. Que será multiplicado por 1000 que es el múltiplo de la dilución (inoculación a 0,001 ml) para dar una estimación del número de bacterias por ml de orina.
6. Si el conteo lo amerita mayor a 100 000 UFC/ml, se continua la identificación de las bacterias, tomando en cuenta el crecimiento en las cajas de agar sangre de cordero y agar MacConkey. El crecimiento en cada medio dará la pauta para sospechar de la bacteria patógena. (Cueto, 2005)

## ANEXO N° 16

### TINCIÓN DE GRAM

1. Se fija las bacterias en una placa con la ayuda de un palillo, se flamea en el mechero.
2. Se coloca solución de Cristal Violeta al 1%. Se deja actuar 1 minuto y se lava. Donde las células se tiñen color violeta.
3. Se coloca solución Yodo. Se deja actuar 1 minuto y se lava. Se da la formación del complejo Yodo – Cristal Violeta en el interior de las células. Las células permanecen violetas Formación del complejo Yodo.
4. Se coloca la solución de alcohol Acetona. Se deja actuar 20 Segundos y se lava. Donde en las bacterias gram positivas el complejo Yodo – Cristal Violeta no sale de las Células, conservan el color violeta. Mientras que en las baterías gram negativas El complejo Yodo – Cristal Violeta se separa de las Células, las que pierden el color y no pueden observarse.
5. Se coloca la solución de Safranina. Se deja actuar 1 minuto y se lava. Las bacterias gram positivas conservan el color Violeta mientras que las bacterias gram negativas son decoloradas y se tiñen de rojo a rosado.

## ANEXO N° 17

### PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN CON DISCOS (BAUER-KIRBY) PARA BACTERIAS SIN REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

#### Principio

Un comité del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ha evaluado y revisado continuamente el procedimiento de difusión con discos. El establecimiento de una prueba estándar nacional para la difusión con discos no sólo ha permitido un control de calidad más exacto, sino también una comparación válida de los resultados entre diferentes laboratorios que utilizan este procedimiento. El comité publica actualizaciones periódicas con nueva información y los cambios sugeridos por los usuarios. Es importante mantener la actualización del procedimiento. (Koneman. 2008)

El diámetro de los halos que se forman con la prueba no tiene sentido sin referencia a los correlatos y guías interpretativas de la concentración inhibitoria mínima (CIM) publicados por el CLSI. (Koneman. 2008)

#### Medios y reactivos

- Aislamiento bacteriano proveniente de un proceso infeccioso.
- Caldo nutritivo (Se recomienda caldo soja digerido de caseína) para el desarrollo del inóculo.
- Estándar 0,5 de McFarland para ajustar la turbidez del inóculo.
- Agitadora vertical para suspender el inóculo.
- Caja visera para la comparación del caldo con el estándar. Puede utilizarse un fotómetro si se demuestran resultados satisfactorios.
- Placas de agar de Mueller-Hinton (de 100 mm de diámetro para 5/discos como máximo; de 150 mm para 12 discos como máximo) provenientes de un lote que produzca resultados satisfactorios en el control de calidad. El pH debe ser de 7,2 a 7,4 y la profundidad del agar aproximadamente de 4 mm.
- Calibres, regla o patrón para medir los diámetros de los halos de inhibición. (Koneman. 2008)

## Procedimiento

- **Preparación del inóculo (método de desarrollo)**

1. Tocar con un ansa metálica la superficie de cuatro o cinco colonias bien aisladas de aspecto similar de un cultivo en placas de agar. Transferir a un tubo de caldo con 4 a 5 ml de un medio líquido apropiado.
2. Incubar el cultivo a 35°C hasta que la turbidez coincida con la del estándar preparado con anterioridad (casi siempre 2 a 6 horas antes) Mezclar en forma enérgica el estándar en la agitadora vertical (Vortex) inmediatamente antes de usar. Utilizar una luz adecuada para leer el tubo contra un fondo blanco con una línea negra de constante. Si fuera necesario agregar solución fisiológica estéril o caldo para obtener a simple vista una turbidez comparable con la del estándar. En el caso de la cepa de *E. coli* para control de calidad, esto equivale a alrededor de 1 a 2 x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC). Como alternativa, puede usarse una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de las colonias de un cultivo de 18 a 24 horas en placa de agar, ajustada al estándar. En ese caso, las bacterias deben haberse desarrollado en un medio nutritivo, no selectivo, como el agar sangre. Los dispositivos comerciales para estandarizar el inóculo sin control de la turbidez ni pre incubación en medio líquido también han tenido un rendimiento aceptable.
3. Antes de transcurridos los 15 minutos después de hacer coincidir la turbidez de la suspensión del inóculo con la del estándar, sumergir un hisopo de algodón no tóxico, estéril, dentro de la suspensión del inóculo y rotarlo varias veces con una presión firme sobre las paredes del tubo, para eliminar el exceso de líquido.
4. Sembrar la superficie seca de una placa de agar de Mueller-Hinton que haya sido llevada a temperatura ambiente estriando el hisopo tres veces sobre toda la superficie del agar, haciendo rotar la placa aproximadamente 60°C cada vez, para asegurar una distribución uniforme del inóculo sobre toda la superficie del agar. Para finalizar, pasar el hisopo por el borde del agar. Colocar la tapa de la placa. Dejar pasar por lo menos 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para que se seque la superficie del agar antes de agregar los discos de antibióticos. (Koneman. 2008)

### **Preparación alternativa del inóculo (suspensión directa de colonias)**

1. Hacer una suspensión directa en caldo o solución fisiológica de colonias provenientes de un cultivo en placa de agar nutritivo, no selectivo (p.ej., agar sangre), incubar durante 18 a 24 horas.
2. Hacer coincidir de inmediato la densidad del inóculo con la densidad del estándar, como se hace en el método de desarrollo.
3. Este método se recomienda para las especies de *Haemophilus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y especies de *Staphylococcus* cuando se prueba la sensibilidad de la oxacilina. (Koneman. 2008)

#### **• Pruebas con antibióticos**

1. Colocar los discos adecuados, impregnados en los antimicrobianos sobre la superficie del agar, utilizando pinzas o aplicadores de multidiscos.
2. Presionar con suavidad cada disco sobre la superficie del agar, para que el contacto sea uniforme. No mover el disco una vez que se haya puesto en contacto con el agar, ya que parte del fármaco se difunde casi de inmediato. Los discos deben distribuirse de manera uniforme sobre el agar, de modo que la distancia centro a centro no sea menor de 24 mm.
3. Invertir las placas y colocarlas en una estufa de aire atmosférico a 35°C durante 16 a 18 horas (24 horas cuando se prueban estafilococos con meticilina u oxacilina, o enterococos con vancomicina). (Koneman. 2008)

### **Resultados**

#### **Interpretación:**

Medida de los diámetros de los halos: examinar las placas después de incubarlas durante la noche. Mediante un calibre, regla o patrón, se miden con cuidado los halos de inhibición completa del desarrollo alrededor de cada disco, redondeando al milímetro más próximo; el diámetro del disco debe incluirse en esta medición. (Koneman. 2008)

Todas las mediciones se hacen a simple vista, observando la placa de Petri desde abajo, con luz reflejada, contra un fondo negro que no refleje. La observación de las placas debe realizarse en sentido vertical, para evitar cualquier paralaje que pueda producir una lectura errónea. Las placas

para determinaciones de sensibilidad preparadas con sangre deben observarse desde la superficie del agar y las mediciones se harán sin la tapa colocada, también la luz dirigida para iluminar la placa. En las referencias de las normas publicadas se proporciona un correlato de interpretación (sensible, moderadamente sensible, intermedio o resistente). Los halos que corresponden al rango intermedio deben considerarse dudosos; si se desea hacer tratamiento con ese fármaco, debe realizarse una prueba de sensibilidad por dilución para aclarar el tema. (Koneman. 2008)

ANEXO N° 18

**Table 3A. Screening and Confirmatory Tests for Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBLs) in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis***

**NOTE:** Following evaluation of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) properties, limited clinical data, and minimal inhibitory concentration (MIC) distributions, revised interpretive criteria for cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime, ceftriaxone, and aztreonam were published in January 2010 (M100-S20) and are listed in Table 2A. Cefuroxime (parenteral) was also evaluated; however, no change in interpretive criteria was required with the dosage. When using the current interpretive criteria, routine ESBL testing is no longer necessary before reporting results (ie, it is no longer necessary to edit results for cephalosporins, aztreonam, or penicillins to resistant). However, ESBL testing may still be useful for epidemiological or infection control purposes. For laboratories that have not implemented the current interpretive criteria, ESBL testing should be performed as described in this table.

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Test method	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Medium	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Antimicrobial concentration	<p>For <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, and <i>E. coli</i>:</p> <p>Cefpodoxime 10 <math>\mu</math>g or                      Ceftazidime 30 <math>\mu</math>g or                      Aztreonam 30 <math>\mu</math>g or                      Cefotaxime 30 <math>\mu</math>g or                      Ceftriaxone 30 <math>\mu</math>g</p> <p>For <i>P. mirabilis</i>:</p> <p>Cefpodoxime 10 <math>\mu</math>g or                      Ceftazidime 30 <math>\mu</math>g or                      Cefotaxime 30 <math>\mu</math>g</p> <p>(The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)</p>	<p>For <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, and <i>E. coli</i>:</p> <p>Cefpodoxime 4 <math>\mu</math>g/mL or                      Ceftazidime 1 <math>\mu</math>g/mL or                      Aztreonam 1 <math>\mu</math>g/mL or                      Cefotaxime 1 <math>\mu</math>g/mL or                      Ceftriaxone 1 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>For <i>P. mirabilis</i>:</p> <p>Cefpodoxime 1 <math>\mu</math>g/mL or                      Ceftazidime 1 <math>\mu</math>g/mL or                      Cefotaxime 1 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>(The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)</p>	<p>Ceftazidime 30 <math>\mu</math>g                      Ceftazidime-clavulanate* 30/10 <math>\mu</math>g  <u>and</u>                      Cefotaxime 30 <math>\mu</math>g                      Cefotaxime-clavulanate 30/10 <math>\mu</math>g</p> <p>(Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.)</p>	<p>Ceftazidime 0.25–128 <math>\mu</math>g/mL                      Ceftazidime-clavulanate 0.25/4–128/4 <math>\mu</math>g/mL  <u>and</u>                      Cefotaxime 0.25–64 <math>\mu</math>g/mL                      Cefotaxime-clavulanate 0.25/4–64/4 <math>\mu</math>g/mL</p> <p>(Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.)</p>
Inoculum	Standard disk diffusion procedure	Standard broth dilution procedure	Standard disk diffusion procedure	Standard broth dilution procedure
Incubation conditions	35 $\pm$ 2°C; ambient air	35 $\pm$ 2°C; ambient air	35 $\pm$ 2°C; ambient air	35 $\pm$ 2°C; ambient air
Incubation length	16–18 hours	16–20 hours	16–18 hours	16–20 hours



Table 3A. (Continued)

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
Test Method	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Results	<p>For <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, and <i>E. coli</i>:</p> <p>Cefpodoxime zone ≤ 17 mm</p> <p>Ceftazidime zone ≤ 22 mm</p> <p>Aztreonam zone ≤ 27 mm</p> <p>Cefotaxime zone ≤ 27 mm</p> <p>Ceftriaxone zone ≤ 25 mm</p> <p>For <i>P. mirabilis</i>:</p> <p>Cefpodoxime zone ≤ 22 mm</p> <p>Ceftazidime zone ≤ 22 mm</p> <p>Cefotaxime zone ≤ 27 mm</p> <p>Zones above may indicate ESBL production.</p>	<p>Growth at or above the screening concentrations may indicate ESBL production (ie, for <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i>, and <i>K. oxytoca</i>, MIC ≥ 8 µg/mL for cefpodoxime or MIC ≥ 2 µg/mL for ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, or ceftriaxone; and for <i>P. mirabilis</i>, MIC ≥ 2 µg/mL for cefpodoxime, ceftazidime, or cefotaxime).</p>	<p>A ≥ 5-mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the zone diameter of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime zone = 16; ceftazidime-clavulanate zone = 21).</p>	<p>A ≥ 3 twofold concentration decrease in an MIC for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the MIC of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime MIC = 8 µg/mL; ceftazidime-clavulanate MIC = 1 µg/mL).</p>
Reporting			<p>For all confirmed ESBL-producing strains:</p> <p>If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam.</p> <p>If laboratories use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, then test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant.</p>	



Table 3A. (Continued)

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
QC Recommendations	<p>When testing ESBL-screening antimicrobial agents, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 is provided as a supplemental QC strain (eg, for training, competency, or test evaluation). Either strain, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 or <i>E. coli</i> ATCC® 25922, may then be used for routine QC (eg, weekly or daily).</p> <p><i>E. coli</i> ATCC® 25922 (see acceptable QC ranges in Table 4A)</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603:                      Cefpodoxime zone 9–16 mm                      Ceftazidime zone 10–18 mm                      Aztreonam zone 9–17 mm                      Cefotaxime zone 17–25 mm                      Ceftriaxone zone 16–24 mm</p>	<p>When testing ESBL-screening antimicrobial agents, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 is provided as a supplemental QC strain (eg, for training, competency, or test evaluation). Either strain, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 or <i>E. coli</i> ATCC® 25922, may then be used for routine QC (eg, weekly or daily).</p> <p><i>E. coli</i> ATCC® 25922 = No growth (also see acceptable QC ranges listed in Table 5A).</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 = Growth:                      Cefpodoxime MIC ≥ 8 µg/mL                      Ceftazidime MIC ≥ 2 µg/mL                      Aztreonam MIC ≥ 2 µg/mL                      Cefotaxime MIC ≥ 2 µg/mL                      Ceftriaxone MIC ≥ 2 µg/mL</p>	<p>When performing the ESBL confirmatory tests, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 and <i>E. coli</i> ATCC® 25922 should be used for routine QC (eg, weekly or daily).</p> <p><b>Acceptable QC:</b>  <i>E. coli</i> ATCC® 25922: ≤ 2-mm increase in zone diameter for antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the zone diameter when tested alone.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603:                      ≥ 5-mm increase in zone diameter of ceftazidime-clavulanate vs ceftazidime alone;                      ≥ 3-mm increase in zone diameter of cefotaxime-clavulanate vs cefotaxime alone.</p>	<p>When performing the ESBL confirmatory tests, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 and <i>E. coli</i> ATCC® 25922 should be tested routinely (eg, weekly or daily).</p> <p><b>Acceptable QC:</b>  <i>E. coli</i> ATCC® 25922: &lt; 3 twofold concentration decrease in MIC for antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the MIC of the agent when tested alone.</p> <p><i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603: ≥ 3 twofold concentration decrease in MIC for an antimicrobial agent tested in combination with clavulanate vs the MIC of the agent when tested alone.</p>

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ESBL, extended-spectrum β-lactamase; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; PK-PD, pharmacokinetic-pharmacodynamic; QC, quality control.

**Footnote**

- a. Preparation of ceftazidime-clavulanate (30 µg/10 µg) and cefotaxime-clavulanate (30 µg/10 µg) disks: Using a stock solution of clavulanate at 1000 µg/mL (either freshly prepared or taken from small aliquots that have been frozen at -70°C), add 10 µL of clavulanate to ceftazidime (30 µg) and cefotaxime (30 µg) disks. Use a micropipette to apply the 10 µL of stock solution to the ceftazidime and cefotaxime disks within one hour before they are applied to the plates, allowing about 30 minutes for the clavulanate to absorb and the disks to be dry enough for application. Use disks immediately after preparation or discard; do not store.

**ANEXO N° 19**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS**

**Encargado:** Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

<b>Código</b>	<b>Fecha</b>	<b>Nombres</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Bacteria identificada</b>	<b>Tamizaje de BLEE</b>



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA DE LA SALUD HUMANA**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS**

**Encargado:** Pablo Andrés Villavicencio Pacheco

Código	TAMIZAJE			CONFIRMACION DE BLEE			
	Ceftazidime 30 ug	Aztreonam 30 ug	Cefotaxime 30 ug	Ceftazidime – Clavulánico 30/10 ug	Ceftazidime 30 ug	Cefotaxime – Clavulánico 30/10 ug	Cefotaxime 30 ug

Loja, 24 de Julio de 2015

Lic. Ángel Luzón Ramírez

**RESPONSABLE DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO  
AYORA**

A petición verbal del interesado, CERTIFICO:

Que el Sr. **Pablo Andrés Villavicencio Pacheco**, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, realizó la parte práctica del trabajo investigativo durante los meses de Marzo, Abril, Mayo y Junio del presente año, el cual incluyó la recolección de urocultivos de usuarios de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, con el objetivo de obtener información correspondiente para insertar en el proyecto de investigación denominado: **“ESCHERICHIA COLI PRODUCTORA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO AISLADA EN UROCULTIVOS DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL GENERAL ISIDRO AYORA.”**, previo a la obtención del título de licenciado en Laboratorio Clínico, trabajo que lo realizó en la forma como se encuentra previsto en la reglamentación correspondiente de esta institución de la que formo parte.

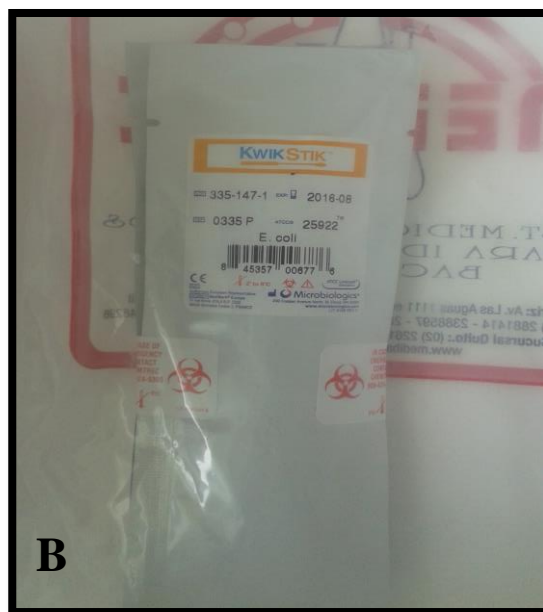
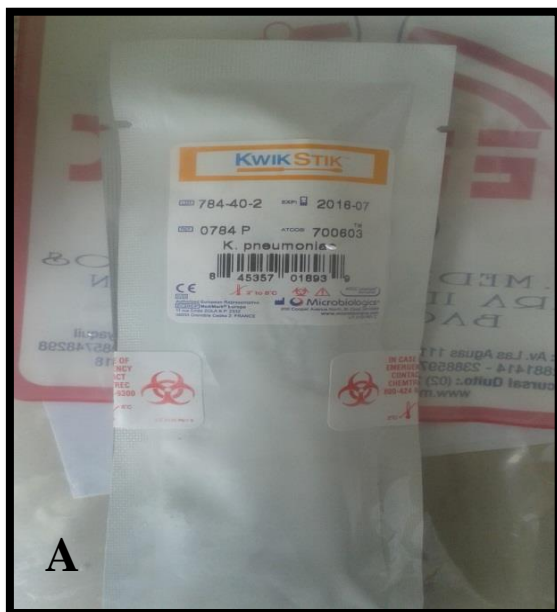
Es cuanto puedo informar en honor a la estricta verdad y faculto al interesado de hacer uso legal que creyera conveniente de la presente certificación.

Atentamente.



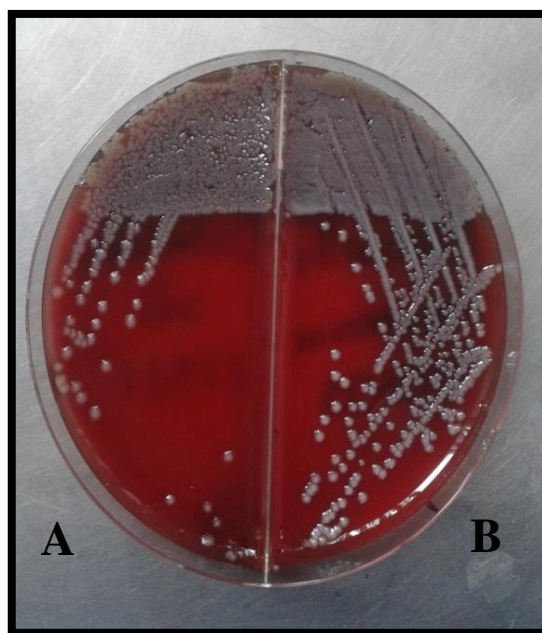
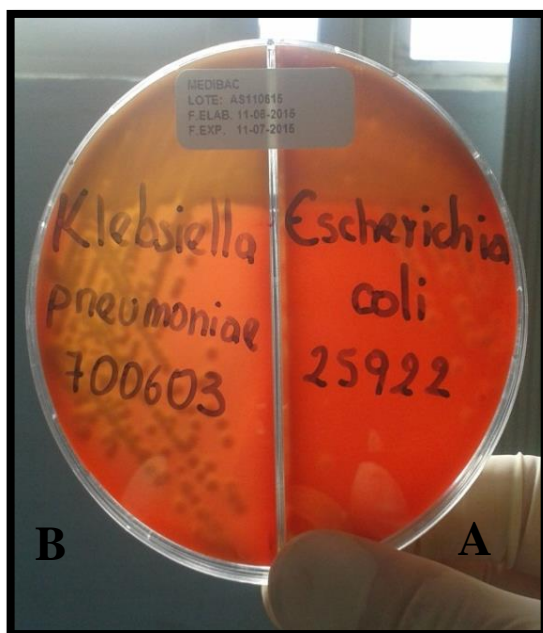
Lic. Angel Luzón Ramírez  
**RESPONSABLE DEL LABORATORIO**

## ANEXO FOTOS

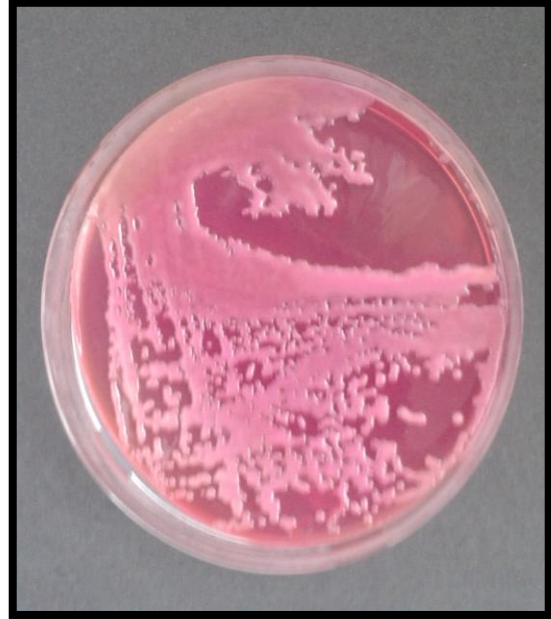


**A.** CEPA DE CONTROL POSITIVO *Klebsiella pneumoniae* 700603.

**B.** CEPA DE CONTROL NEGATIVO *Escherichia coli* 25922







*Klebsiella pneumoniae* 700603 en Agar MacConkey



*Escherichia coli* 25922 en agar MacConkey



**PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *Klebsiella pneumoniae***



**PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *Escherichia coli***





**CONTROL DE CALIDAD DE DISCOS Y AGAR MUELLER HINTON  
CONTROL POSITIVO**

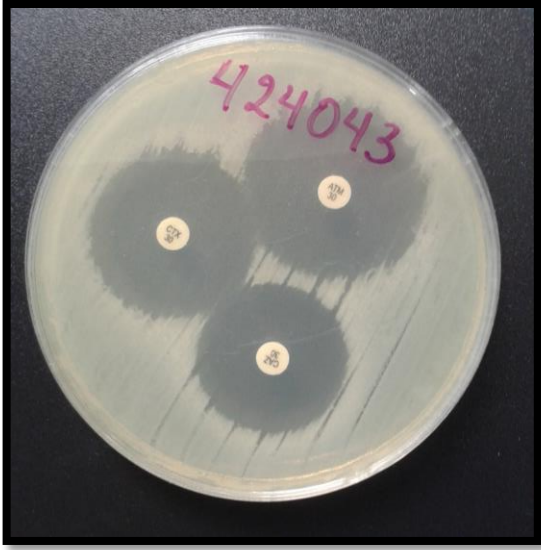


**CONTROL NEGATIVO**



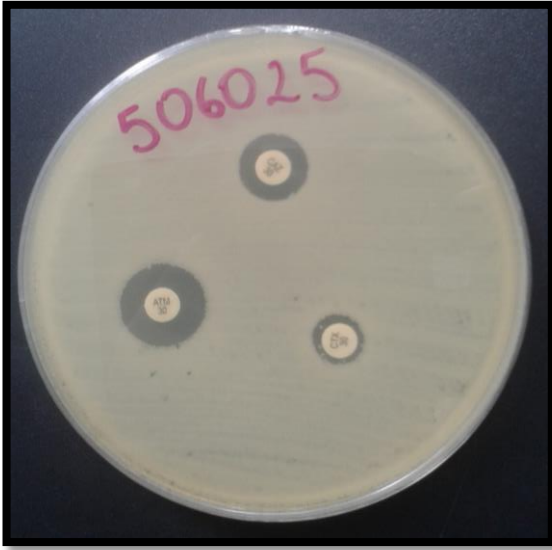
**CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS  
DE CONTROL**



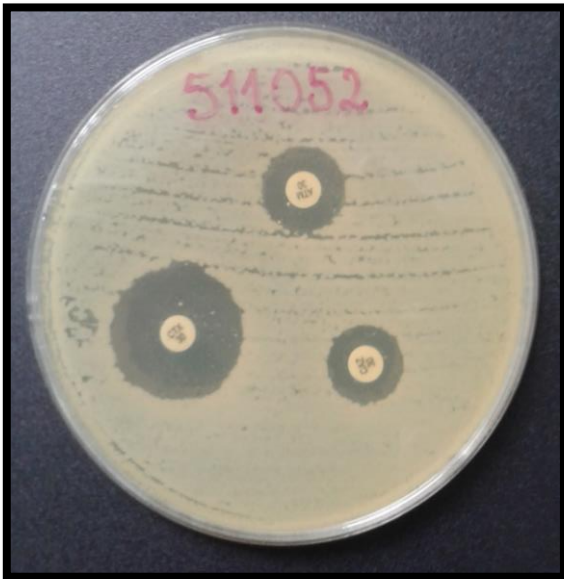


**CEPAS NO PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO  
EXTENDIDO**





**CEPAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO**



## I. ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
PORTADA .....	.i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA .....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA.....	.v
AGRADECIMIENTO .....	vi
a. TÍTULO.....	1
b. RESUMEN .....	2
SUMMARY .....	3
c. INTRODUCCIÓN .....	4
d. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	6
1. INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS .....	6
1.1. CONCEPTO .....	6
1.2. FACTORES PREDISponentES .....	6
1.2.1. EDAD .....	6
1.2.2. SEXO.....	6
1.2.3. MANEJO DE ANTIBIÓTICOS.....	7
1.2.4. ASPECTOS GENÉTICOS .....	7
1.2.5. OTROS FACTORES.....	7
1.3. DIAGNÓSTICO.....	8
1.3.1. SIGNOS Y SÍNTOMAS .....	8
1.3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	8
1.3.2.1. EMO .....	8

1.3.2.2. UROCULTIVO .....	9
2. ENTEROBACTERIAS .....	10
2.1. GENERALIDADES .....	10
2.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	10
2.2.1. GENERALIDADES .....	10
2.2.2. MORFOLOGÍA .....	11
2.2.3. TAXONOMÍA .....	11
2.2.4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA .....	11
2.2.5. IDENTIFICACIÓN EN EL LABORATORIO .....	11
2.2.5.1. MEDIOS DE CULTIVO .....	11
2.2.5.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS .....	12
2.2.5.3. MÉTODOS SEROLÓGICOS .....	14
2.2.5.4. MÉTODOS AUTOMATIZADOS .....	15
2.2.6. SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS .....	16
3. ANTIBIÓTICOS .....	16
3.1. CONCEPTO .....	16
3.2. CLASIFICACIÓN .....	16
3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN .....	18
3.4. ANTIBIÓTICOS PARA ENTEROBACTERIAS .....	19
4. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	21
4.1. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO .....	21
4.2 OTROS MECANISMOS .....	22
5. ANTIBIOGRAMA .....	22
5.1. GENERALIDADES .....	22
5.2. MÉTODO DE ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN KIRBY-BAUER .....	23

5.3. IDENTIFICACIÓN DE BLEE EN EL LABORATORIO.....	24
5.3.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN Y DILUCIÓN.....	24
5.3.2. CONFIRMACIÓN DE BLEE.....	25
e. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
TIPO DE ESTUDIO.....	26
ÁREA DE ESTUDIO .....	26
UNIVERSO.....	26
MUESTRA.....	26
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	26
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	26
PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS .....	27
Fase pre-analítica.....	27
Fase analítica .....	27
Fase post-analítica .....	28
PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	28
f. RESULTADOS.....	29
g. DISCUSIÓN.....	35
h. CONCLUSIONES.....	37
i. RECOMENDACIONES .....	38
j. BIBLIOGRAFÍA.....	39
k. ANEXOS .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla N°1: <i>Escherichia coli</i> aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, Abril-Junio de 2015 .....	29
Tabla N°2: <i>Escherichia coli</i> productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital General Isidro Ayora, Abril-Junio de 2015.....	31
Tabla N°3: <i>Escherichia coli</i> productora de betalactamasas de espectro extendido según sexo.....	32
Tabla N°4: <i>Escherichia coli</i> productora de betalactamasas de espectro extendido según edad.....	33
Tabla N°5: <i>Escherichia coli</i> productora de betalactamasas de espectro extendido y su relación con las infecciones de vías urinarias recurrente .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1: Oficio dirigido al gerente del Hospital solicitando permiso para trabajar con las muestras del laboratorio clínico del Hospital General Isidro Ayora .....	44
Anexo 2: Oficio al jefe del laboratorio del Hospital General Isidro Ayora para solicitud y autorización del uso de las instalaciones .....	46
Anexo3: Formato de la encuesta realizada a las personas de consulta externa .....	47
Anexo 4: Inserto del Agar Sangre de cordero MEDIBAC .....	48
Anexo 5: Agar MacConkey .....	50
Anexo 6: Agar Mueller Hinton .....	52
Anexo 7: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) .....	54
Anexo 8: Agar Simmons Citrato .....	56
Anexo 9: Agar Urea Base Christensen .....	58
Anexo 10: Agar Lisina Hierro .....	60
Anexo 11: Agar Motilidad SIM .....	62
Anexo 12: Reactivo de Kovacs .....	64
Anexo 13: Protocolo para activación de cepas de control .....	66
Anexo 14: Protocolo para conservación de cepas de control .....	67
Anexo 15: Técnica de dilución con asa calibrada .....	68
Anexo 16: Tinción de GRAM .....	69
Anexo 17: Prueba de sensibilidad por difusión con discos (Bauer-Kirby) para bacterias sin requerimientos nutricionales.....	70
Anexo 18: Protocolo para prueba de tamizaje y confirmación según el manual del CLSI M100-S24 .....	74
Anexo 19: Formato de registro de resultados .....	77
Anexo 20: Certificado del jefe de laboratorio del Hospital General Isidro Ayora.....	79
ANEXO FOTOS .....	80